

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÉGULATION DE LA PROTÉINE L-ISOASPARTATE MÉTHYLTRANSFÉRASE PAR
LES DÉRIVÉS RÉACTIFS DE L'OXYGÈNE : IMPACT SUR SON EXPRESSION ET
SON ORGANISATION STRUCTURELLE DANS LES FRACTIONS
MITOCHONDRIALES

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR
IRVENS FANÉLUS

JANVIER 2012

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord le Dr Richard Desrosiers qui m'a supervisé durant mes années d'études graduées. Je n'aurais pas pu passer à travers cette période sans le dévouement, la patience, le respect et la gentillesse que vous avez témoigné à mon égard. Je remercie aussi tous les collègues de travail que j'ai eu le privilège de côtoyer durant mes études. Je tiens à remercier ma fiancée Sherny pour son support et son dévouement inconditionnel. Je tiens à remercier également ma mère, Marie Anne, qui m'a encouragé et inspiré comme seule une mère peut le faire. Je remercie l'ensemble de ma famille, ma belle-famille et mes amis pour leur encouragement. Pour terminer, je remercie le département de chimie de l'UQÀM ainsi que le fonds à l'accessibilité et à la réussite des études (FARE) pour leur soutien financier.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	viii
RÉSUMÉ.....	x
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Les enzymes de réparation	1
1.2 Un bref historique de la PIMT.....	2
1.3 Les protéines accumulent des résidus L-isoaspartates anormaux.....	3
1.3.1 La PIMT répare les protéines en catalysant la méthylation des résidus L- isoaspartates anormaux.....	4
1.3.2 Les propriétés de la PIMT	8
1.3.3 La réparation des résidus L-isoaspartates par la PIMT préserve l'intégrité des protéines	9
1.4 La PIMT est fortement exprimée au cerveau.....	11
1.4.1 La déficience en PIMT conduit à l'épilepsie chez la souris.....	13
1.4.2 L'expression de la PIMT et autres exemples de maladies du cerveau.....	15
1.4.3 La PIMT et neuropharmacologie.....	16
1.5 L'expression subcellulaire de la PIMT.....	18
1.6 La formation des DRO.....	20
1.6.1 Le dommage oxydatif des protéines.....	22
1.7 La formation de DRO par les NADH/NADPH oxydases.....	24
1.8 La formation de DRO par la chaîne mitochondriale de transport d'électrons	27
1.9 Objectifs de la recherche.....	30
CHAPITRE II	
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	33

2.1 Matériel.....	33
2.2 Méthodes.....	34
2.2.1 Culture cellulaire et traitements.....	34
2.2.2 Préparation des lysats cellulaires.....	34
2.2.3 Purification de la fraction mitochondriale.....	35
2.2.4 Mesures des DRO, du PMM et de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux.....	35
2.2.5 Transfection des cellules avec un siRNA contre la TrxR1 et la PIMT.....	37
2.2.6 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide et électrotransfert.....	37
2.2.7 Immunodétection des protéines par buvardage Western.....	38
2.2.8 Électrophorèse 2-D.....	39
2.2.9 Essai de méthylation de la PIMT dans les gels de polyacrylamide.....	39
2.2.10 Analyses statistiques.....	40

CHAPITRE III

RÉSULTATS.....	41
3.1 L'expression de la PIMT est stimulée par le PAO	41
3.2 L'induction de la PIMT est dépendante de la propriété du PAO à réagir avec les cystéines vicinales.....	42
3.3 L'expression de la PIMT est stimulée par la formation des DRO induits par le PAO.....	43
3.4 L'inhibition du niveau d'expression de la PIMT accroît la formation des DRO induits par le PAO.....	44
3.5 Le BSO, un inhibiteur de la synthèse du GSH, stimule l'expression de la PIMT dans les cellules de neuroblastomes.....	45
3.6 L'expression de la PIMT est induite dans les mitochondries lors d'une perturbation mitochondriale.....	45
3.7 Les fractions mitochondries contiennent deux isoformes spécifiques de la PIMT.....	47
3.8 La perturbation mitochondriale par le CCCP déclenche la formation de multimères de la PIMT dans les mitochondries.....	47
3.9 La formation des multimères de PIMT est prévenue par l'acide ascorbique.....	48

3.10 La perturbation mitochondriale augmente la quantité de résidus aspartates endommagés sur les protéines avec un haut poids moléculaire élevé.....	49
3.11 Activation des multimères de la PIMT lors de la perturbation mitochondriale par le CCCP.....	50

CHAPITRE IV

DISCUSSION.....	63
-----------------	----

CHAPITRE V

CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	72
---------------------------------	----

ANNEXE I

FIGURES SUPPLÉMENTAIRES.....	76
------------------------------	----

ANNEXE II

CONTRIBUTIONS PERSONNELLES.....	81
---------------------------------	----

ANNEXE III

CONTRIBUTION À LA RÉDACTION D'UN ARTICLE DE REVUE.....	88
--	----

ANNEXE IV

LISTE DES PRÉSENTATIONS À DES COLLOQUES ET CONGRÈS SCIENTIFIQUE.....	100
---	-----

ANNEXE V

RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES OBTENUS AU COURS DU DOCTORAT.....	102
---	-----

BIBLIOGRAPHIE.....	108
--------------------	-----

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 La formation des résidus L-isoaspartates	3
1.2 Mécanismes de réparation des protéines par la PIMT	5
1.3 Modèle de liaison de la PIMT au résidu L-isoaspartate des protéines.....	6
1.4 Schéma structurel de la PIMT humaine	8
1.5 Distribution tissulaire de la PIMT	12
1.6 Classement des protéines de la substance blanche du cerveau.....	13
1.7 Apparence du cerveau chez les souris PIMT ^{-/-} et PIMT ^{+/+} âgées de 5 semaines.....	15
1.8 La distribution subcellulaire des protéines du cerveau fœtal humain	20
1.9 Schéma des systèmes oxydants et antioxydants de la cellule.....	22
1.10 L'interconnexion entre l'oxydation des protéines, des acides nucléiques et de lipides.....	23
1.11 La structure du PAO et son produit de réaction avec les cystéines vicinales.....	24
1.12 La structure proposée de la région principale des NADPH oxydases.....	25
1.13 Assemblage et activation de Nox2 au niveau des membranes de vésicules intracellulaires.....	26
1.14 La chaîne de transport d'électrons	28
1.15 La production des DRO par la chaîne mitochondriale de transport d'électrons.....	29
3.1 Le PAO induit l'expression de la PIMT.....	52
3.2 La PIMT est stimulée par le PAO en oxydant les résidus cystéines vicinaux indépendamment de la thiorédoxine réductase.....	53
3.3 La stimulation de la PIMT est dépendante de la formation des DRO induits par le PAO.....	54

3.4 La déficience en PIMT augmente le niveau de formation de DRO par le PAO.....	55
3.5 Stimulation de l'expression de la PIMT par le BSO.....	56
3.6 La perturbation mitochondriale induit l'expression de la PIMT dans les fractions mitochondriales.....	57
3.7 Analyse sur gels bidimensionnels de la PIMT associée aux fractions mitochondriales.....	58
3.8 Les multimères de PIMT sont formés à partir de monomères liés par des ponts disulfures.....	59
3.9 L'antioxydant acide ascorbique bloque la formation des multimères de PIMT.....	60
3.10 Accumulation de résidus aspartates endommagés sur les protéines de poids moléculaire élevé dans les fractions mitochondriales lors d'un traitement avec le CCCP.....	61
3.11 La stimulation de l'activité enzymatique des multimères de PIMT induite par le CCCP est dépendante des liens disulfures.....	62
4.1 Schéma proposant les mécanismes par lesquels les DRO régulent l'expression des monomères et multimères de PIMT.....	71

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AdoMet	S-adénosyl-L-méthionine
AdoHcy	S-adénosyl-L-homocystéine
ADN	acide désoxyribonucléique
APS	persulfate d'ammonium
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
BCA	acide bicinchonique
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BSO	L-Buthionine-sulfoximine
CCCP	carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
CHAPS	3-[3-cholamidopropyl]-diméthylamino]-1-propanesulfonate
CHX	cycloheximide
Da	dalton
dbSNP	<i>single nucleotide polymorphism database</i>
DCHF-DA	2',7'-dichlorofluorescein diacétate
DCNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene
DMSO	diméthylsulfoxyde
DPI	chlorure de diphenyleneiodonium
DRN	dérivées réactifs du nitrogène
DRO	dérivés réactifs de l'oxygène
DSIPisoD	<i>(β-Asp5)-delta-sleep inducing peptide</i>
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide éthylène-diamine-tétraacétique
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FAD	flavine adénine dinucléotide
GSH	glutathion
GSK-3	<i>glycogen synthase kinase 3</i>
GPx	<i>Glutathione peroxidase</i>
Hepes	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
Hsp70	<i>heat shock protein 70</i>
IEF	<i>isoelectric focusing</i>
kDa	kilodalton
MAP1B	<i>microtubule-associated protein 1B</i>
NAC	N-acétylcystéine
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NEM	N-éthylmaléimide
NP-40	Nonidet P-40
NO	oxyde nitrique
Nox	NADH/NADPH oxydase
PAO	phénylarsine oxyde

PBS	tampon phosphate salin
PDVF	difluorure de polyvinylidène
pI	point isoélectrique
PIMT	protéine L-isoaspartate méthyltransférase
PMM	potentiel membranaire mitochondrial
Prx	peroxyrédoxines
Rh123	rhodamine 123
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SDS	dodécyl sulfate de sodium
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SH-SY5Y	cellules de neuroblastomes humain
siRNA	<i>short interfering ribonucleic acid</i>
SOD	superoxyde dismutase
TBHP	tert-butylhydroperoxyde
TBS	tampon tris salin
TÉM	témoin
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TxR1	thiorédoxine réductase 1
U87	cellules d'astrocytomes humain
UVA	rayons ultraviolets A

RÉSUMÉ

La protéine L-isoaspartate méthyltransférase (PIMT) répare les protéines endommagées par la formation de résidus L-isoaspartates anormaux. Elle est majoritairement exprimée et active dans le cerveau. Or, la déficience en PIMT est largement associée à différentes maladies neurologiques tandis qu'une élévation de son niveau d'expression semble jouer un rôle protecteur. La PIMT est communément caractérisée comme une protéine monomérique du cytosol. Nous nous intéressons particulièrement aux mécanismes qui régulent son expression et son activité. Les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) peuvent agir comme des messagers secondaires des voies de signalisation physiologiques, par contre, l'accumulation de ceux-ci peut causer des dommages oxydatifs et contribuer fortement à l'altération des processus cellulaires. En raison de divers facteurs, les cellules cérébrales peuvent être plus vulnérables face à une augmentation des DRO (stress oxydatif). Pourtant, il existe peu d'information concernant la régulation de la PIMT par les DRO dans le cerveau. Par ailleurs, les mitochondries sont les principales sources de DRO intracellulaires et leur association avec les désordres neurologiques est de plus en plus rapportée. Malgré le fait que la PIMT est aussi présente et active dans les mitochondries, aucune étude n'a encore examiné la régulation de son expression dans ces organites.

L'objectif de cette thèse était de démontrer que les DRO régulent l'expression de la PIMT. Dans un premier volet, nous avons investigué les effets des DRO sur l'expression de la PIMT. Le phénylarsine oxyde (PAO) est une molécule dérivée de l'arsenic qui altère les protéines en oxydant les résidus cystéines vicinales (voisines sur la chaîne polypeptidique). En premier lieu, nous rapportons que la synthèse de la PIMT est rapidement stimulée par le traitement des cellules d'astrocytomes humains U87 avec le PAO. Nous avons aussi confirmé que l'augmentation de l'expression de la PIMT par le PAO était dépendante de protéines possédant des cystéines vicinales. De manière importante, nous avons observé que l'augmentation de l'expression de la PIMT corrélait avec la formation de DRO induite par le PAO. De façon convaincante, nous avons pu démontrer que la formation des DRO et la stimulation de l'expression de la PIMT par le PAO étaient bloquées par l'agent antioxydant N-acétylcystéine ainsi que par l'inhibition de la NADH/NADPH oxydase avec le chlorure de diphenyleneiodonium. De plus, nous avons montré que l'inhibition de l'expression de la PIMT par siRNA accroissait significativement la formation des DRO induits par le PAO, indiquant que la PIMT agissait indirectement comme une protéine antioxydante.

Dans un deuxième volet, nous avons caractérisé la PIMT associée aux mitochondries. Nous avons trouvé que la PIMT est exprimée sous une forme monomérique, dimérique et multimérique dans les fractions mitochondriales des cellules de neuroblastomes humains, les SH-SY5Y. L'analyse par électrophorèse bidimensionnelle a révélé deux isoformes spécifiques de la PIMT dans les fractions mitochondriales. Lorsque nous avons traité les cellules avec le carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP), un agent découplant qui perturbe l'activité mitochondriale, l'expression et l'activité des monomères de PIMT ont diminué alors que l'expression et l'activité des multimères de PIMT ont été stimulées. De

manière significative, l'assemblage des multimères de PIMT est le résultat de monomères de PIMT liés par des ponts disulfures car le traitement des multimères avec un agent réducteur comme le dithiothréitol les transforme en monomères de PIMT. L'acide ascorbique, un antioxydant, bloque significativement la formation des multimères de PIMT induite par le CCCP, validant que les DRO contribuent à la multimérisation de la PIMT. De plus, on a trouvé que le CCCP conduit à l'accumulation des résidus aspartates endommagés sélectivement au niveau des protéines avec un haut poids moléculaire. Il est particulièrement intéressant de noter que l'élévation de l'activité catalytique des multimères de la PIMT par le CCCP a été drastiquement inhibée par l'agent réducteur dithiothréitol. Ces résultats indiquent que les monomères de PIMT sont généralement inactifs après les traitements au CCCP et que l'activation des multimères de PIMT est essentiellement dépendante de la formation des liens disulfures entre monomères de PIMT.

Cette thèse rapporte la régulation de la PIMT par les DRO et démontre que cette enzyme de réparation est une nouvelle protéine antioxydante. En plus, elle met en évidence que les DRO contribuent à la multimérisation et l'activation de la PIMT dans les mitochondries. Ces travaux de recherche mettent en lumière un nouveau champ d'étude sur la PIMT.

«Mots-clés : protéine L-isoaspartate méthyltransférase, dérivés réactifs de l'oxygène, mitochondries, liens disulfures, multimères»

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Les enzymes de réparation

Les fonctions physiologiques sont dépendantes de l'expression et de l'activité des protéines. Il est donc crucial de maintenir l'intégrité des protéines dont les résidus d'acides aminés sont enclins à des modifications délétères. Par exemple, l'oxydation, la glycation et la désamidation (isomérisation) des acides aminés sont des processus non enzymatiques qui altèrent la structure et la fonction des protéines (Gomord et Faye, 2004). Les protéines ainsi endommagées sont généralement dégradées par les différentes voies protéolytiques de la cellule. À l'opposé, l'accumulation des protéines endommagées est favorisée par divers facteurs dont le vieillissement cellulaire, une condition où l'on observerait un déclin de l'activité protéolytique, notamment du protéasome (Chondrogianni et Gonos, 2010). En parallèle, les cellules expriment des enzymes qui ont pour fonction la réparation des dommages aux protéines. Celles-ci se divisent selon trois groupes : les prolines isomérases, qui convertissent les résidus cis-prolines anormaux en résidus trans-prolines, un autre groupe inclut les enzymes impliquées dans la conversion des résidus méthionines sulfoxydes (méthionines oxydés) en résidus méthionines normales, et finalement la protéine L-isoaspartate méthyltransférase (PIMT), qui reconnaît et répare spécifiquement les résidus L-isoaspartates anormaux (Clarke, 2003). La PIMT, qui fera l'objet de cette thèse, est une enzyme communément associée au vieillissement et à différents désordres cérébraux. On appendra comment les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) régulent son expression et son activité au niveau intracellulaire et mitochondrial.

1.2 Un bref historique de la PIMT

En 1965, Axelrod et Daley ont remarqué que lorsqu'ils ajoutaient du [^3H]-S-adénosyl-L-méthionine ([^3H]-AdoMet) à des extraits pituitaires, il y avait une production de méthanol radioactif (Axelrod et Daley, 1965). Ce fut la première observation de l'activité de méthylation, mais aucune enzyme ne fut identifiée. Par ailleurs, la libération de méthanol radioactif est toujours la méthode généralement utilisée pour les essais de méthylation de la PIMT. Deux ans plus tard, l'équipe de Liss a rapporté la méthylation de l'ovalbumine et de l'albumine de sérum humain dépendante de la S-adénosyl-L-méthionine (AdoMet) par une enzyme purifiée de la rate de veau (Liss et Edelstein, 1967; Liss et Maxam, 1967). Cette équipe a ensuite montré la purification partielle d'une enzyme de méthylation de la rate de veau (Liss, Maxam et Cuprak, 1969). En 1970, une autre équipe a rapporté la purification d'une enzyme de méthylation dépendante de l'AdoMet et elle a été nommée protéine méthylase II (Kim et Paik, 1970). Trois ans plus tard, on est arrivé à la conclusion que les enzymes rapportées par l'équipe de Liss et celle de Kim et Paik étaient la même qu'Axelrod et Daley avaient découverte (Aswad, 1995). Par la suite, il y a eu la confirmation d'une activité carboxyle méthyltransférase dans l'hypophyse ainsi que la démonstration que certaines hormones de l'hypophyse antérieure étaient des accepteurs de groupements méthyles plus efficaces que l'ovalbumine (Diliberto et Axelrod, 1974).

Les années passèrent et plus de 60 articles portant sur la carboxyle méthyltransférase chez les eucaryotes ont été publiés. Les recherches portaient sur les propriétés et les fonctions de l'enzyme. Plusieurs suggestions ont été émises, allant d'un rôle dans la circulation vésiculaire à l'entreposage des hormones (Clarke, 1985; Barten et O'Dea, 1990). Il a même été rapporté que la carboxyle méthylation des protéines membranaires des bactéries était impliquée dans la régulation de la réponse chimiotactique (Kort *et al.* 1975). En 1984, l'équipe d'Aswad a démontré que le groupement carboxyle libre sur le résidu L-isoaspartate de l'hormone adrénocorticotrope était un excellent site de méthylation pour l'enzyme (Aswad, 1984). En parallèle, une autre étude menée par l'équipe de Clarke a démontré que le résidu L-isoaspartate était le meilleur substrat de l'enzyme (Murray et Clarke, 1984). C'est dès lors que cette enzyme fut appelée protéine L-isoaspartate méthyltransférase.

1.3 Les protéines accumulent des résidus L-isoaspartates anormaux

Les résidus asparagines et aspartates sont enclins à subir des réactions chimiques spontanées. Notamment, la désamidation des résidus asparagines survient lors d'une attaque nucléophile de l'atome d'azote de l'acide aminé adjacent en position C-terminal, générant un intermédiaire cyclique, le L-succinimide (fig. 1.1). L'isomérisation par déshydratation des résidus aspartates résulte d'une réaction identique. Étant instable, le L-succinimide s'hydrolyse pour donner un mélange formé de résidus L-isoaspartates anormaux et L-aspartates normaux. La présence de résidus L-isoaspartates altère la structure de la chaîne polypeptidique en introduisant une liaison peptidique au groupement carboxyle de la chaîne latérale des résidus asparagines et aspartates.

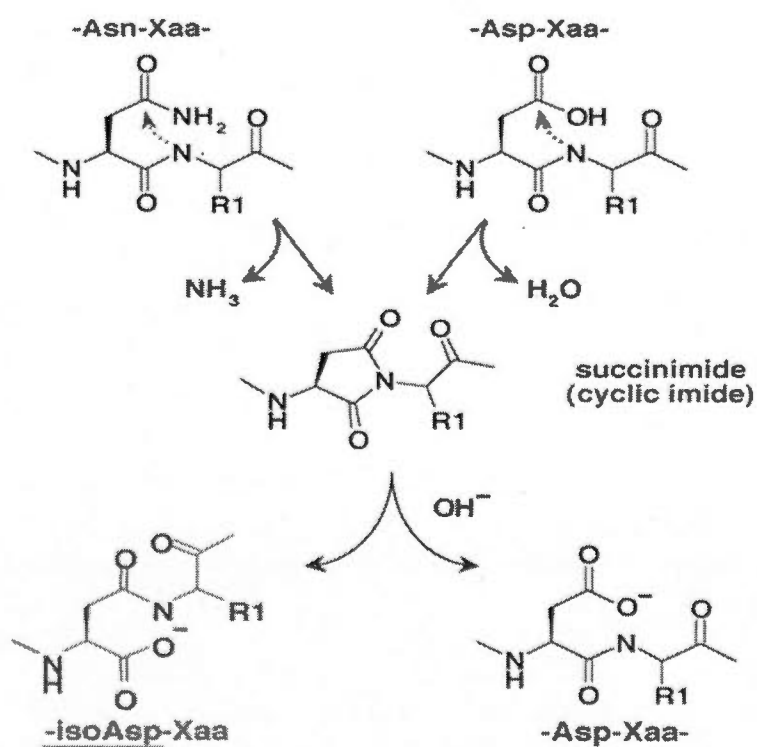


Figure 1.1 La formation des résidus L-isoaspartates. (Tirée de Reissner et Aswad, 2003)

La désamidation des asparagines ou l'isomérisation des aspartates est défavorisée par les structures secondaires et tertiaires des protéines. Une augmentation de la flexibilité de la chaîne polypeptidique par absence d'encombrement stérique favoriserait la formation des résidus L-isoaspartates. Par exemple, la vitesse de formation du résidu L-isoaspartate est de 30 à 50 fois supérieure quand le résidu glycine est situé après le résidu asparagine ou aspartate (Smith *et al.* 2002). La formation des résidus L-isoaspartates serait aussi favorisée lorsque la structure tridimensionnelle des protéines est soumise à différentes conditions perturbatrices telles que l'oxydation et le stress thermique (Clarke, 2003). Dans le cas des dommages oxydatifs aux protéines, l'influence du vieillissement cellulaire a largement été rapportée (Squier, 2001). D'un autre côté, les protéines semblent accumuler des résidus L-isoaspartates en fonction de l'âge (Desrosiers et Fanélus, 2010). L'ensemble de ces observations sont en accord avec les études qui démontrent que le traitement des érythrocytes avec tert-butylhydroperoxyde (TBHP), un puissant agent oxydant, induit la formation de résidus L-isoaspartates (Ingrosso *et al.* 2000; Ingrosso *et al.* 2002).

1.3.1 La PIMT répare les protéines en catalysant la méthylation des résidus L-isoaspartates anormaux

La formation de résidus L-isoaspartates perturbe la structure des protéines, ce qui peut provoquer une diminution de leur activité et éventuellement le dysfonctionnement de la cellule (Shimizu *et al.* 2005). La PIMT catalyse le transfert d'un groupement méthyle de l'AdoMet au groupement α -carboxyle d'un résidu L-isoaspartate d'une protéine (fig. 1.2). La S-adénosyl-L-homocystéine (AdoHcy) est par la suite formée en tant que produit secondaire et inhibiteur compétitif de la réaction de méthylation. Le lien méthyle ester est spontanément hydrolysé pour générer un intermédiaire succinimide avec dégagement de méthanol. L'intermédiaire succinimide instable est finalement hydrolysé en résidu L-aspartate et L-isoaspartate selon un rapport 3 : 7 par cycle de méthylation. Soulignons que la PIMT humaine et la PIMT chez le thermophile *P. furiosus* reconnaissent aussi le résidu D-aspartate et similairement initie sa conversion en résidus L-aspartate. (Thapar et Clarke, 2000). Toutefois, la méthylation du résidu D-aspartate s'effectue avec un rendement de 1500 à 20000 fois inférieur à celui du résidu L-isoaspartate (Clarke et Lowenson, 1992).

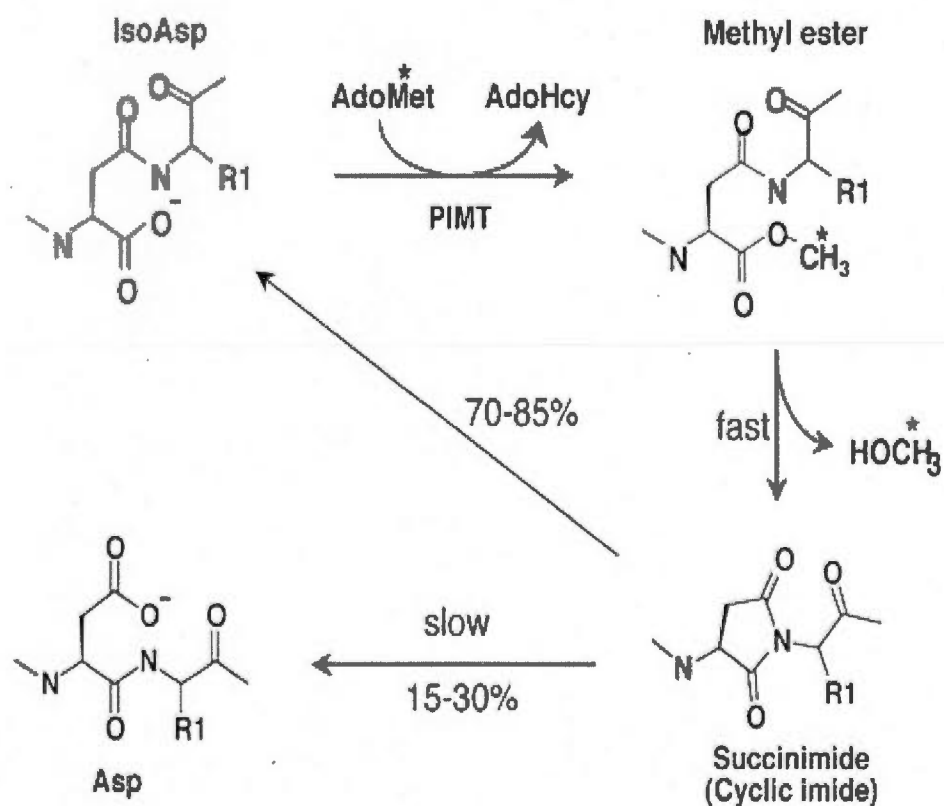


Figure 1.2 Mécanismes de réparation des protéines par la PIMT. (Tirée de Reissner et Aswad, 2003)

À partir de la structure cristalline de la PIMT, on a pu proposer que le mécanisme enzymatique pour la PIMT soit de type séquentiel bi-bi ordonné puisque les résidus à l'extrémité C-terminale impliqués dans la liaison avec l'AdoHcy forment aussi le site de liaison aux substrats. Or, un changement de conformation au niveau de ces résidus doit avoir lieu afin de libérer l'AdoHcy et permettre l'entrée et la liaison de l'AdoMet ainsi que la liaison des substrats au site actif de la PIMT (Skinner *et al.* 2000; Smith *et al.* 2002). De plus, un modèle de liaison des protéines contenant des résidus L-isoaspartates (substrats) au site actif de la PIMT humaine a été proposé (Smith *et al.* 2002), tel qu'illustré à la figure 1.3.

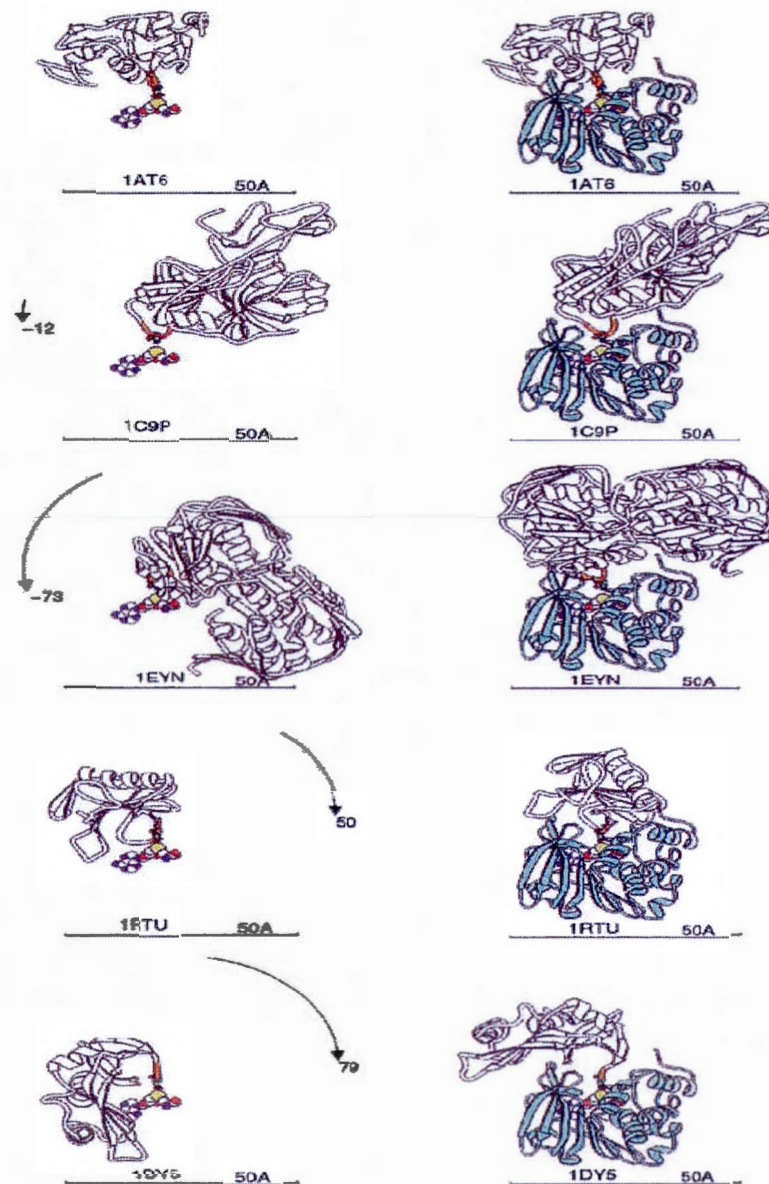


Figure 1.3 Modèle de liaison de la PIMT au résidu L-isoaspartate des protéines. (Tiré de Smith *et al.* 2002). Les substrats de la PIMT sont représentés en blanc à gauche : 1AT6, «*hen egg white lysozyme*»; 1C9P, «*porcine trypsin*»; 1EYN, «*enoylpyruvate transferase*»; 1RTU, «*Ustilago sphaerogena ribonuclease*» U2; 1DY5, «*bovine pancreatic ribonuclease*». Les régions contenant le L-isoaspartate sont représentées en orange au niveau des substrats. L'AdoMet, représenté par des sphères de la couleur d'atomes respectifs, sert de point de référence. Les PIMT humaines sont représentées en vert à droite.

On peut observer que la majorité des substrats doivent effectuer une rotation pour permettre l'ancrage du résidu L-isoaspartate à la PIMT (fig. 1.3). Par contre, une rotation n'est pas requise pour la protéine 1AT6 (lysozyme). Leur modèle expérimental a permis d'observer qu'un changement conformationnel (dénaturation) est nécessaire pour que la ribonucléase (IDY5) soit réparée par la PIMT tandis que le lysozyme est réparé par la PIMT tout en conservant sa structure native. Or, une étude avait déjà démontré que le lysozyme, sous sa conformation native, était un excellent substrat de la PIMT humaine des érythrocytes (Lowenson et Clarke, 1991). Ce modèle suggère que les résidus aspartates endommagés sur certaines protéines ne seraient pas reconnus par la PIMT. D'ailleurs, il a été rapporté que la PIMT réparerait avec beaucoup moins d'efficacité les résidus aspartates endommagés au niveau des agrégats neurofibrillaires constitués de la protéine tau (Goggins, Scott et Weir, 1999; Payan *et al.* 1992).

Il a été rapporté que dix cycles de méthylation entraîneraient la réparation complète d'une protéine (Johnson *et al.* 1987). L'utilisation de dix équivalents d'ATP sous la forme d'AdoMet serait ainsi nécessaire, alors que la dégradation et la synthèse d'une nouvelle protéine requièrent des milliers de molécules d'ATP (Reissner et Aswad, 2003). Ce qui suggère qu'il serait plus favorable pour la cellule de réparer les résidus L-isoaspartates que procéder à la dégradation des protéines désamidées ou isomérisées. Par ailleurs, il a été proposé que la désamidation de l'asparagine ne soit pas strictement associée aux dommages des protéines (Robinson et Robinson, 2004). En appui à cela, il a été montré une augmentation du nombre de récepteurs de l'insuline dans le cerveau de souris déficiente en PIMT (Farrar, Houser et Clarke, 2005). De plus, une étude a récemment rapporté que la kinase ERK est hyperphosphorylée dans les cellules où l'expression de la PIMT a été inhibée par siRNA et par la suite traitées avec le «*epidermal growth factor*» (Furuchi *et al.* 2010). Ces études ont aussi démontré l'accumulation de résidus L-isoaspartates, suggérant que la méthylation (réparation) de ces résidus par la PIMT contribue à la régulation des processus cellulaires.

1.3.2 Les propriétés de la PIMT

Chez l'humain, il existe majoritairement deux isoformes de la PIMT résultant de l'épissage alternatif d'un gène situé sur le chromosome 6 (MacLaren et al. 1992a). L'isoforme I a un point isoélectrique (pI) de 6.5 et une séquence C-terminale Arg-Trp-Lys-COOH tandis que l'isoforme II se distingue par un pI de 5.5 avec une séquence C-terminale Arg-Asp-Glu-Leu-COOH (MacLaren *et al.* 1992b). Le rôle que pourrait jouer les différences observées en région C-terminale n'a pas encore été élucidé. On peut tout de même constater que la séquence C-terminale de l'isoforme II est similaire à celle qui sert de signal de rétention au réticulum endoplasmique : Lys-Asp-Glu-Leu-COOH (Potter *et al.* 1992). Deux autres isoformes mineures de la PIMT (pI 5.7 et 5.9) ont été rapportées comme étant plus exprimées dans les tissus cérébraux normaux comparativement aux tissus cérébraux de patients épileptiques (Lanthier *et al.* 2002).

La PIMT est largement décrite et caractérisée comme une enzyme monomérique de 226 acides aminés d'un poids moléculaire de 24 500 Da (fig. 1.4). Elle contient une alanine à l'extrémité N-terminal qui est acétylée et trois domaines de liaison de l'AdoMet. Le rôle de la N-acétylation n'a pas encore été déterminé. Une étude récente chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* a montré que la N-acétylation des protéines sur les résidus Met, Ala, Val, Ser, Thr, et Cys peut agir comme signal de dégradation, et ces protéines seraient reconnu par la Doa10 ubiquitine ligase (Hwang *et al.* 2010).

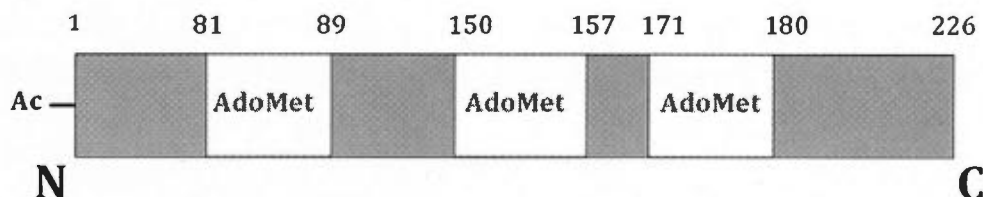


Figure 1.4 Schéma structurel de la PIMT humaine. (Tirée de Desrosiers et Fanélus, 2011)

Dans le même ordre d'idée, la PIMT humaine possède deux cystéines (Cys-42 et Cys-94) dont la distance de séparation (20 Å) permet d'exclure la possibilité qu'elle puisse former des ponts disulfures (Ryttersgaard *et al.* 2002). Une troisième cystéine a été identifiée en position 102 (DeVry *et al.* 1996). Le rôle de ces résidus cystéines sur l'organisation structurale de la PIMT n'a jamais été rapporté. De plus, une analyse protéomique a permis d'identifier la PIMT parmi les protéines étant phosphorylées sur tyrosines (Amanchy *et al.* 2005). Il est important de souligner que les phosphotyrosines représentent moins de 1% du total des acides aminés phosphorylés dans la cellule (Monteiro *et al.* 2008). De ce fait, l'investigation du rôle que joue cette modification sur la PIMT pourrait fournir des données qui permettraient de mieux comprendre sa fonction de réparation des protéines et son rôle physiologique.

Selon le «*Single Nucleotide Polymorphism Database*» (dbSNP), l'acide aminé en position 120 de la PIMT est polymorphe (Ile120Val, *rs4816*, anciennement nommé Ile119Val, *rs11155687*). L'analyse de l'activité catalytique des isoformes Ile¹²⁰ et Val¹²⁰ dans les érythrocytes humains a indiqué que l'isoforme Ile¹²⁰ a une plus grande thermo-stabilité et activité spécifique tandis que l'isoforme Val¹²⁰ a une plus forte affinité pour les substrats isomérisés (David *et al.* 1997). Au niveau clinique, le polymorphisme Ile120Val du gène de la PIMT serait un facteur de risque pour le spina bifida, une malformation congénitale qui résulte d'un défaut de fermeture du tube neural durant le développement embryonnaire. Or, une réduction du risque de développer le spina bifida a été associée avec le génotype Val/Val de la PIMT (Zhu *et al.* 2006; Mitchell, 2004).

1.3.3 La réparation des résidus L-isoaspartates par la PIMT préserve l'intégrité des protéines

La protéine recombinante TRAIL induit l'apoptose dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses et serait un agent anticancéreux potentiel (Huerta *et al.* 2007). Lorsqu'elle est exprimée à grande échelle dans *Escherichia coli*, la protéine recombinante TRAIL forme des agrégats et les méthodes employées en vue de la rendre soluble ne sont pas rentables. En revanche, une équipe a démontré que la protéine recombinante TRAIL est considérablement solubilisée lorsqu'elle est conjointement exprimée avec la forme recombinante de la

PIMT (Zhu *et al.* 2006). Ces résultats indiquent que la réparation des résidus L-isoaspartates par la PIMT contribue à la solubilisation de la protéine recombinante TRAIL dans *Escherichia coli*. Cette technique peut être transposée à d'autres systèmes de production de protéines recombinantes.

Dans un contexte physiologique normal, les protéines chaperons telle que Hsp70 assurent le repliement adéquat des protéines et participent aux mécanismes de survie cellulaire (Leu *et al.* 2009). Il n'existe pas encore de relation claire entre l'activité de la PIMT et le repliement des protéines. Cependant, certaines observations expérimentales laissent présumer que la PIMT contribue à maintenir la structure native des protéines. Par exemple, l'hyperphosphorylation et l'agrégation de la protéine tau sont des processus fortement associés à la maladie d'Alzheimer (Grill et Cummings, 2010). Or, on a détecté la présence de résidus L-isoaspartates sur des sites spécifiques d'une forme structurelle anormale de la protéine tau, suggérant que la formation de résidus L-isoaspartates serait un autre facteur contribuant à son hyperphosphorylation et son agrégation (Watanabe *et al.* 1999). Ces résultats sont en accord avec les études montrant l'accumulation de résidus L-isoaspartates sur la protéine tau dans le cerveau de souris déficientes en PIMT (Shimizu *et al.* 2000; Yamamoto *et al.* 1998).

Le collagène de type I est une protéine de la matrice extracellulaire impliquée dans l'adhésion et la migration des cellules (Staatz *et al.* 1991). Les protéines de la matrice extracellulaire ont généralement une demi-vie longue et sont donc susceptibles d'accumuler des résidus aspartates anormaux (Lindner et Helliger, 2001). Un exemple frappant des conséquences fonctionnelles de la réparation des protéines découle de l'étude sur le vieillissement *in vivo* du collagène de type I menée par Lanthier et Desrosiers (2004). Tout d'abord, ils ont observé une augmentation des résidus L-isoaspartates sur le collagène provenant de la queue de rats de 20 mois comparativement au collagène de la queue de rats âgés de 3 mois. La migration des cellules a été significativement réduite sur une matrice composée de collagène de 20 mois. À l'inverse, il y a eu un déclenchement de la migration des cellules quand le collagène de 20 mois a été réparé par la PIMT. Donc, cette étude

indique que la réparation des résidus L-isoaspartates du collagène par la PIMT agirait sur la motilité des cellules.

Dans le même ordre d'idée, les perturbations de la matrice extracellulaire peuvent être attribuées à la destruction du collagène qui est une caractéristique clinique dans différentes maladies dont l'arthrite rhumatoïde (Sun, 2010). Étant donné que des études ont rapporté la présence de la PIMT dans le milieu extracellulaire (Cortesi *et al.* 2009; Molina *et al.* 2005), il serait intéressant d'étudier le rôle que joue la formation des résidus L-isoaspartates dans la progression de cette maladie.

1.4 La PIMT est fortement exprimée au cerveau

La recherche a montré dès 1976 que le cerveau était le tissu exprimant la plus forte activité catalytique de la PIMT (Diliberto et Axelrod, 1976). Plus tard, une analyse par immunobuvardage de type Northern a démontré que l'ARNm de la PIMT de rats âgés de 150 jours était majoritairement exprimé dans le cerveau et le testicule par rapport aux tissus tels que le cœur, le muscle et le poumon (Mizobuchi *et al.* 1994). Par la suite, les résultats en ARNm ont été confirmés au niveau protéique (Boivin *et al.* 1995). En effet, l'analyse de la distribution tissulaire de la PIMT par immunobuvardage de type Western a confirmé que c'est au cerveau que le plus haut niveau d'expression de l'enzyme était observé, suivie par le testicule et le cœur (fig. 1.5). En relation avec les niveaux d'expression tissulaire de PIMT, les souris déficientes pour la PIMT montrent un niveau plus élevée de résidus L-isoaspartates particulièrement dans le cerveau, le testicule et le cœur (Lowenson *et al.* 2001).

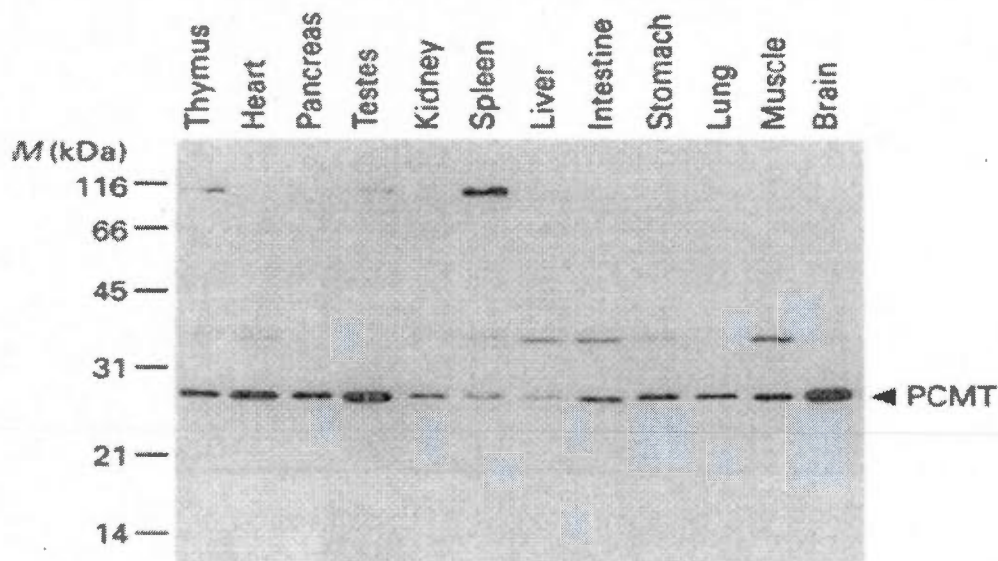


Figure 1.5 Distribution tissulaire de la PIMT. (Tirée de Boivin *et al.* 1995)

D'un autre côté, les résultats d'analyses immunohistochimiques du cerveau de rats âgés de 8 semaines ont démontré que la PIMT était fortement exprimée dans les neurones tandis que les cellules gliales en exprimaient un niveau plus faible (Shirasawa *et al.* 1995). De plus, chez les rats âgés de 2 ans, l'immunoréactivité de l'anticorps de la PIMT est accrue au niveau des neurones de l'hippocampe, du cortex cérébral et du tronc cérébral (Shirasawa *et al.* 1995). Antérieurement, une étude similaire avait rapporté que la PIMT était surtout localisée dans le cortex, l'hippocampe, le corpus striatum, le thalamus et l'amygdale (Billingsley, Kim et Kuhn, 1985). L'ensemble de ces résultats démontrent l'omniprésence de la PIMT dans le tissu cérébral.

Une analyse protéomique a révélé que la PIMT, entre autres, était exprimée dans le cerveau fœtal humain (Fountoulakis *et al.* 2002). Les auteurs de cette étude avancent que l'identification des protéines du cerveau qui sont exprimées au premier stade de la vie permettrait de mieux comprendre les mécanismes associés au développement de maladies neurologiques. Par ailleurs, la PIMT a aussi été identifiée au niveau de la substance blanche

du cerveau par électrophorèse bidimensionnelle (2-D) suivie par la spectrométrie de masse (Mucelli *et al.* 2006). Cette étude a été réalisée à partir de cerveau post mortem. La PIMT a été classée parmi les protéines impliquées dans la réponse aux stress. Celles-ci représentaient le deuxième plus important groupe de protéines de la substance blanche du cerveau (fig. 1.6).

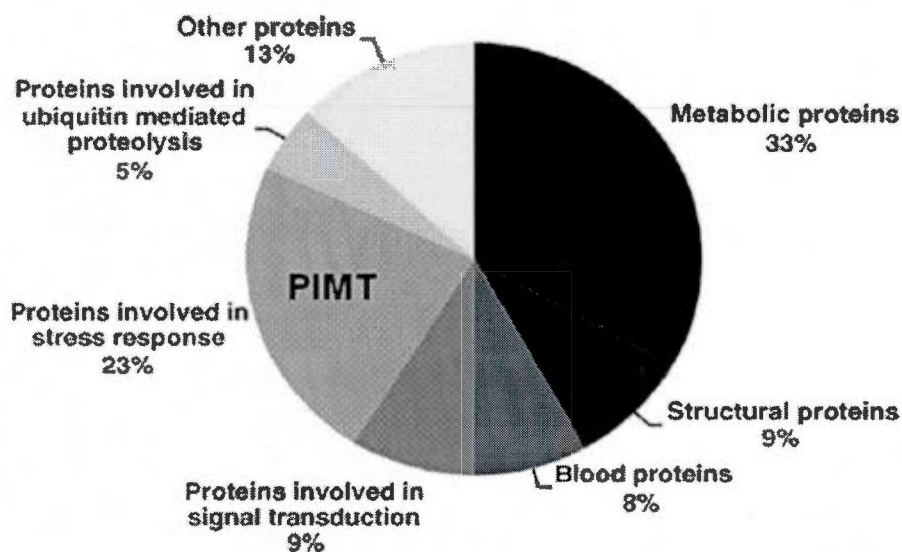


Figure 1.6 Classement des protéines de la substance blanche du cerveau. (D'après Mucelli *et al.* 2006)

1.4.1 La déficience en PIMT conduit à l'épilepsie chez la souris

Le cerveau est le tissu dans lequel la PIMT est majoritairement exprimée et dans lequel on détecte la plus forte activité catalytique de cette enzyme. En supposant que la formation des résidus isoaspartates est essentiellement limitée par l'activité de la PIMT, on conçoit qu'une déficience en cette enzyme aurait des conséquences néfastes sur les fonctions cérébrales. C'est en adoptant un raisonnement similaire que Yamamoto *et al.* (1998) ont mis en lumière le lien entre la PIMT et l'épilepsie.

D'une part, ils ont montré que les souris témoins (PIMT+/+) avaient un fort niveau d'expression et d'activité enzymatique de la PIMT dans le cerveau et le testicule. En comparaison, les souris dont le gène de la PIMT a été altéré (PIMT-/-) n'exprimaient pratiquement plus la PIMT au niveau de ces mêmes tissus (Yamamoto *et al.* 1998). De plus, le niveau d'activité enzymatique de la PIMT était presque absent. Le cerveau des souris PIMT -/- montrait une accumulation de résidus aspartates endommagés sous la forme de L-isoaspartates. Sur le plan phénotypique, les souris déficientes pour la PIMT affichaient un poids inférieur et un cerveau plus gros par rapport aux souris témoins (fig. 1.7). De manière frappante, ils ont observé que la survie des souris PIMT-/- était considérablement réduite (les souris mouraient au bout de 4 à 13 semaines). Une amélioration du taux de survie de ces souris a été constatée par l'administration d'un médicament antiépileptique (l'acide valproïque). Néanmoins, les souris déficientes pour la PIMT mouraient au bout de 4 à 13 semaines. Des analyses plus poussées ont confirmé que la mort des souris PIMT-/- était due à des convulsions épileptiques. Au niveau cellulaire, ils ont observé une altération dans l'organisation des microtubules dans le cerveau des souris déficientes en PIMT comparativement aux souris témoins. En accord avec ces observations, ils ont montré que le cerveau des souris déficientes pour la PIMT affichait une augmentation des résidus L-isoaspartates sur certaines protéines associées aux microtubules, particulièrement la protéine tau. Dans une seconde étude, l'expression transgénique de la PIMT dans le cerveau des souris PIMT-/- a permis à celles-ci d'éviter la mort par épilepsie (Shimizu *et al.* 2002). En sommes, les résultats présentés par ces deux études démontrent le rôle protecteur de la PIMT contre certains dérèglements pathologiques.

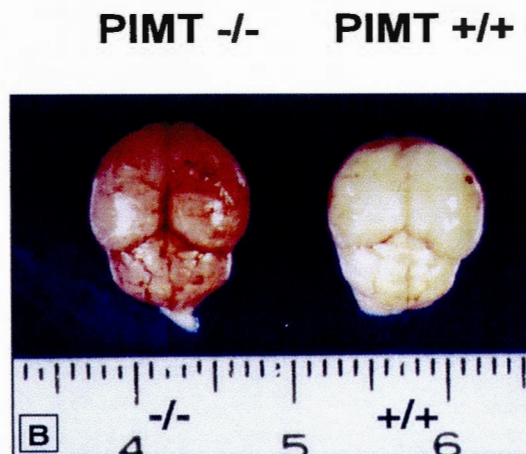


Figure 1.7 Apparence du cerveau chez les souris PIMT^{-/-} et PIMT^{+/+} âgées de 5 semaines. (Tirée de Yamamoto *et al.* 1998)

1.4.2 L'expression de la PIMT et autres exemples de maladies du cerveau

L'âge est un facteur déterminant dans la progression de plusieurs maladies, particulièrement celles associées au cerveau (Wilson *et al.* 2010). En comparant le cerveau d'individus âgés entre 26-42 ans par rapport à ceux âgés entre 73-106 ans, il a été trouvé que l'expression de plusieurs gènes, dont celui de la PIMT, étaient significativement diminués (Lu *et al.* 2004). On peut présumer qu'une baisse dans l'expression génique de la PIMT au cours du vieillissement corrélait avec celle de la protéine, conduisant à l'accumulation de protéines endommagées dans le cerveau. En appui avec cela, une étude antérieure avait montré une perturbation de la transmission synaptique ainsi que la dégénération de la région de l'hippocampe CA3 chez les souris déficiente en PIMT (Ikegaya *et al.* 2001).

Les tumeurs cérébrales sont très invasives et souvent résistantes aux diverses formes de thérapies (Beasley et Toms, 2011). De plus, les tumeurs cérébrales peuvent entraîner diverses complications cliniques incluant l'épilepsie chez les patients pédiatriques (Prayson, 2010). Le rôle de la formation des résidus L-isoaspartates et de l'expression de la PIMT dans le cancer demeure un champ d'étude peu exploré. Pourtant, notre laboratoire a rapporté une réduction

de l'expression ainsi que de l'activité de la PIMT en fonction du grade des tumeurs de types glioblastomes chez l'humain (Lapointe *et al.* 2005).

La dégénérescence cortico-basale est une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte des neurones et l'atrophie de différentes régions du cerveau (Felician *et al.* 2009). Les symptômes de cette maladie apparaissent habituellement vers l'âge de 60 ans et sont similaires à ceux observés dans la maladie de Parkinson (Chen *et al.* 2005; Boeve, 2007). Étonnamment, à partir d'analyses par électrophorèse 2-D des protéines isolées du cerveau d'individus ayant été atteints par la dégénérescence cortico-basale, on a pu montrer que la PIMT est une des deux protéines dont l'expression était à la hausse (Chen *et al.* 2005).

À partir d'échantillons cérébraux isolés de patients schizophréniques, une analyse protéomique a montré que l'expression de la PIMT est augmentée de 2.57 fois (Martins-de-Souza *et al.* 2008). La schizophrénie serait en partie reliée à une perturbation de la synaptogenèse et de la plasticité neuronale (Smalla *et al.* 2008). Les premiers symptômes se déclarent chez les hommes entre 16 et 25 ans et chez les femmes entre 16 et 35 ans. Contrairement à l'ensemble des résultats de la littérature qui suggère que la déficience en PIMT est associée à la perturbation neurologique, la dégénérescence cortico-basale et la schizophrénie sont des désordres neurologiques plutôt associés à une stimulation de l'expression de la PIMT. Il reste à élucider si cette augmentation de la PIMT est une cause ou une conséquence de ces maladies. De plus, il serait intéressant d'étudier la possibilité que le niveau d'expression de la PIMT dans le cerveau puisse servir de marqueur pathologique.

1.4.3 La PIMT et la neuropharmacologie

La PIMT est fortement exprimée dans le cerveau et semble jouer un rôle déterminant dans le maintien de l'intégrité cérébrale. Il est intéressant d'observer que l'expression de la PIMT est modulée par des médicaments couramment utilisés pour le traitement de maladies neurologiques. Par exemple, le niveau d'ARNm de la PIMT est plus élevé dans les cellules gliales exposées au CGP3466, un composé équivalent au médicament antiparkinsonien *R*-deprenyl (Huebscher *et al.* 1999; Tatton *et al.* 1994). L'action antiparkinsonienne du *R*-

deprenyl passe par l'inhibition des monoamines oxydases qui sont responsables de l'oxydation de la dopamine en acide 3,4-dihydroxyphenylacétique. Conséquemment, le *R*-deprenyl prévient aussi la formation de radicaux libres par l'inhibition des monoamines oxydases (Magyar *et al.* 2010). De plus, le *R*-deprenyl stimule l'expression du superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase (enzymes antioxydantes) dans le cerveau de rats (Carrillo *et al.* 1991). Par ailleurs, à de faibles concentrations qui n'inhibent pas les monoamines oxydases, le *R*-deprenyl et le CGP3466 préviennent la mort cellulaire par apoptose selon un mécanisme qui dépend de la synthèse de nouvelles protéines (Tatton *et al.* 1994). Par ailleurs, il a été démontré que la surexpression de la PIMT prévient l'apoptose induite par Bax (Huebscher *et al.* 1999).

Le lithium est généralement utilisé dans le traitement du désordre bipolaire (Stambolic *et al.* 1996). L'acide valproïque est un médicament antiépileptique qui est aussi employé pour traiter le désordre bipolaire (Kostrouchova *et al.* 2007; Rosenberg, 2007). Les souris déficientes pour la PIMT voient leur survie augmentée après l'administration d'acide valproïque (Yamamoto *et al.* 1998). Lorsqu'on traite les lignées d'astrocytomes U-87 et de neuroblastomes SH-SY5Y avec de l'acide valproïque, on constate une forte élévation du niveau d'expression et d'activité enzymatique de la PIMT (Cournoyer et Desrosiers, 2009). Similairement, l'expression de la PIMT est stimulée par le lithium dans les cellules U-87 (Lamarre et Desrosiers, 2008). Le mécanisme d'action du lithium et de l'acide valproïque serait en partie relié à l'inhibition de la protéine proapoptotique GSK-3 ainsi qu'à la stimulation des voies de survie cellulaire (Brunello, 2004; Bielecka et Obuchowicz, 2008). En conséquence, la surexpression cellulaire de la PIMT au cours de l'inhibition de l'activité de GSK-3 pourrait prévenir la formation de résidus L-isoaspartates sur les protéines. On pourrait considérer la protéine antiapoptotique Bcl-xL dont la déamidation a été démontrée par le traitement cellulaire avec l'agent anticancéreux cisplatine (Deverman *et al.* 2002).

1.5 L'expression subcellulaire de la PIMT

La structure de la PIMT est évolutivement conservée et ne présente pas de motifs qui suggèrent qu'elle puisse être localisée dans un compartiment subcellulaire particulier (Bennett *et al.* 2003). De plus, la PIMT ne contient pas de séquence signal qui est caractéristique des protéines membranaires et des protéines sécrétées dans le milieu extracellulaire (Halic *et al.* 2006). En fait, la majorité des études portant sur la PIMT la caractérise comme une enzyme cytosolique (Desrosiers et Fanélus, 2011). Pourtant, la PIMT a été détecté parmi les protéines sécrétées dans le fluide d'hémodialyse humain aussi bien que dans le fluide interstitiel de tumeurs cancéreuses du sein (Molina *et al.* 2005; Cortesi *et al.* 2009). Étant donné que la PIMT ne contient pas de séquence signal, elle serait plutôt sécrétée selon un mécanisme non conventionnel. Par exemple, le «*fibroblast growth factor-2*» peut être transporté au milieu extracellulaire via des protéines formant des canaux membranaires (Nickel et Seedorf, 2008).

La membrane plasmique fait partie d'un réseau membranaire qui comprend le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les lysosomes, les peroxysomes, la membrane nucléaire et les membranes mitochondriales. Des études ont rapporté la purification et la caractérisation de la PIMT au niveau des membranes du cortex rénal de rats (Gingras *et al.* 1991; Gingras *et al.* 1994). Selon une autre étude, la structure et les propriétés catalytiques de cette forme membranaire de la PIMT ne diffèrent pas significativement de la forme soluble (Boivin *et al.* 1993). Ces données suggèrent que la PIMT serait plutôt liée aux membranes par l'interaction avec une ou plusieurs protéines.

Une étude a montré que la PIMT interagit avec le «*microtubule-associated protein 1B*» (MAP1B), une protéine cytosquelettique majeure qui contribue au développement cérébral (Cueille *et al.* 2007; Riederer, 2007). Ces résultats pourraient expliquer pourquoi on observe des changements dans l'organisation du cytosquelette des souris dont l'expression de la PIMT a été supprimée (Yamamoto *et al.* 1998).

Dans le même ordre d'idée, la protéine 4.1 est une protéine membranaire qui est modifiée par la formation de résidus L-isoaspartates en réponse à un stress oxydatif (Ingrosso *et al.* 2000). Chez les patients trisomiques, elle fait partie des protéines érythrocytaires qui ont significativement réagit aux essais de méthylation, indiquant qu'elle accumule des résidus L-isoaspartates dans cette condition clinique (Galletti *et al.* 2007). La protéine 4.1 est particulièrement importante pour les érythrocytes car elle participe au maintien des interactions avec les protéines du cytosquelette (Diakowski *et al.* 2006). Par exemple, la protéine 4.1 peut interagir avec le cytosquelette en liant la région C-terminale de la tubuline (Correas et Avila, 1988). En parallèle, il a été démontré que la tubuline accumule des résidus L-isoaspartates dans les expériences de vieillissement *in vitro* et *in vivo* (Najbauer *et al.* 1996). Notamment, la β -tubuline a été identifiée comme un substrat majeur de la PIMT dans les cerveaux épileptiques humains (Lanthier *et al.* 2002).

En excluant les protéines du cytosol, le cerveau fœtal humain serait majoritairement constitué de protéines mitochondriales (fig. 1.8). Une étude parue en 1973 a révélé des niveaux significativement élevés d'activité catalytique de la PIMT dans les fractions mitochondriales du cerveau de rats (Paik et Kim, 1973). Plus tard, une équipe a montré que la PIMT est fortement exprimée au niveau des mitochondries isolées du cortex rénal de rats (Boivin *et al.* 1995). De plus, l'activité enzymatique de la PIMT a été détectée dans les mitochondries isolées du foie de rats (Kharbanda *et al.* 2007). Chez l'humain, une analyse protéomique a montré que la PIMT est exprimée dans les mitochondries purifiées à partir de tissus cardiaques (Taylor *et al.* 2003).

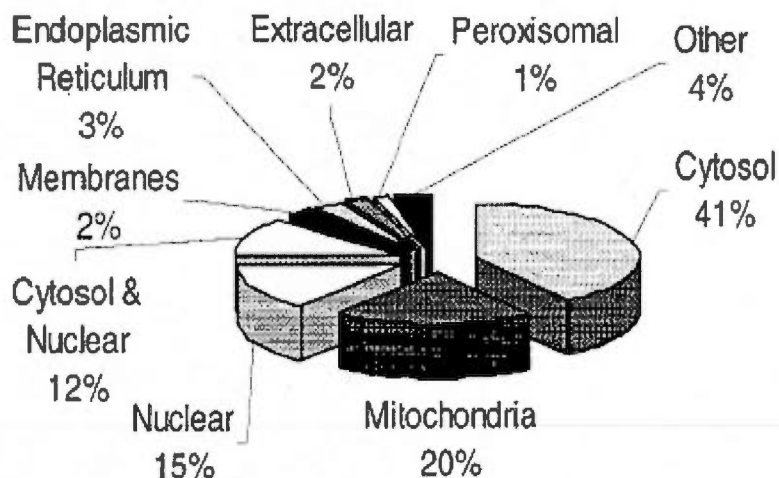


Figure 1.8 La distribution subcellulaire des protéines du cerveau foetal humain. (Tirée de Fountoulakis *et al.* 2002)

Dans cette section, nous avons discuté du rôle et des propriétés de la PIMT tout en cherchant à mettre en évidence son importance dans le cerveau. Dans la prochaine section nous aborderons la théorie concernant les DRO. Nous mettrons l'accent sur les dommages oxydatifs des protéines et le rôle des mitochondries dans la formation des DRO.

1.6 La formation des DRO

Les radicaux libres sont des molécules ayant au moins un électron non apparié. Cette condition rend les molécules instables et elles réagissent en donnant ou en soutirant un électron d'une autre molécule. On parle de DRO pour regrouper l'ensemble de dérivés chimiques radicalaires et non radicalaires de l'oxygène. L'intérêt pour les DRO ne cesse de grandir. Or, les DRO sont des médiateurs importants des réponses physiologiques, allant de la défense immunitaire à la régulation des voies de signalisation. À l'inverse, les DRO peuvent endommager les protéines, l'ADN et les lipides membranaires. Ceci se produit

quand le rapport entre les mécanismes de défense antioxydante et la formation de DRO diminue, générant ainsi un stress oxydatif.

Le premier DRO généré par la cellule est le superoxyde ($O_2^{\cdot -}$). Les mitochondries sont les principales sources de production de $O_2^{\cdot -}$. D'autres sources de $O_2^{\cdot -}$ inclut les NADH/NADPH oxydases et la xanthine oxydase (Elahi *et al.* 2009). Le $O_2^{\cdot -}$ est rapidement converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par les superoxydes dismutases (SOD) au niveau des mitochondries et du cytosol (fig. 1.9). Le H_2O_2 n'est pas un radical libre en tant que tel, mais sa capacité à pénétrer les membranes et à générer d'autres DRO le rend très important pour la cellule. Le H_2O_2 peut réagir avec le Fe^{2+} ou le Cu^+ (réaction de Fenton) et généré le radical hydroxyle ($\cdot OH$). Étant très réactif, ce dernier entraîne la peroxydation des lipides membranaires, et l'oxydation de l'ADN et des protéines. La formation du $\cdot OH$ est toutefois limitée par l'activité d'enzymes antioxydantes comme les catalases, les peroxyrédoxines (Prx) et les glutathions peroxydases (GPx). Ces derniers utilisent le glutathion (GSH) comme substrat afin de catalyser la réduction du H_2O_2 en molécules d'eau (H_2O) et d'oxygène (O_2) (fig. 1.9) (Nordberg et Arnér, 2001). Le GSH est un antioxydant non enzymatique très important pour la cellule à un point où sa déplétion cellulaire peut induire un stress oxydatif (Merad-Boudia *et al.* 1998). Parallèlement, le $O_2^{\cdot -}$ réagit avec l'oxyde nitrique (NO) et entraîne la formation de dérivées réactifs de l'azote (DRN) dont le peroxynitrite (ONOO \cdot) en est le représentant majeur (Valko *et al.* 2006).

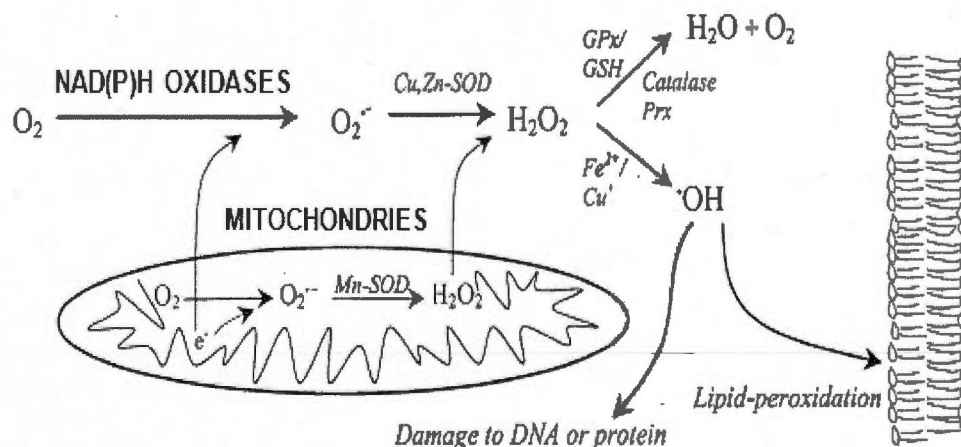


Figure 1.9 Schéma des systèmes oxydants et antioxydants de la cellule. (Tirée de Nordberg et Arnér, 2001)

1.6.1 Le dommage oxydatif des protéines

Les dommages oxydatifs des protéines est en relation direct avec les modifications oxydatives des acides nucléiques et des lipides. Tel que représenté à la figure 1.10, l'oxydation des acides nucléiques comme l'ADN ou l'ARN peut causer des erreurs dans la traduction des protéines et conduire à l'expression de protéines anormales. Ces protéines sont plus enclines à l'oxydation par les DRO (Dukan *et al.* 2000; Ballesteros *et al.* 2001). Les protéines normales peuvent aussi subir l'attaque des DRO en raison de différentes conditions qui favorisent la formation des DRO au dépend des systèmes antioxydants. Les DRO peuvent aussi endommager les lipides membranaires et ainsi induire la génération de dérivés aldéhydes hautement réactifs et toxiques comme l'acroléine (Aldini *et al.* 2006). L'agrégation des protéines peut survenir lorsque les protéines normales réagissent soit avec les dérivés aldéhydes, soit avec les protéines oxydées. Les protéines oxydées et les agrégats de protéines sont généralement dégradés en peptides et acides aminés (Stadtman, 2004).

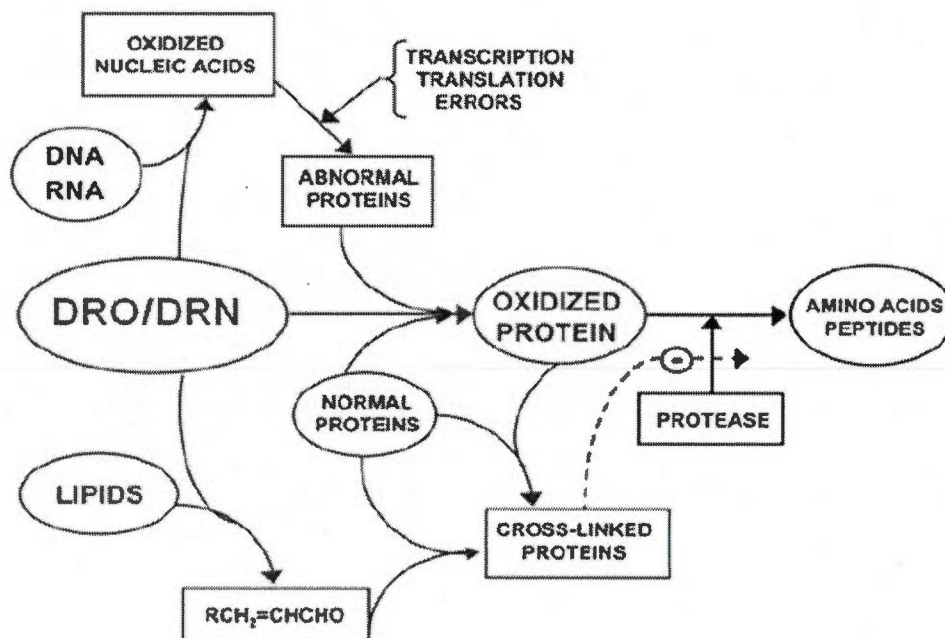


Figure 1.10 L'interconnexion entre l'oxydation des protéines, des acides nucléiques et des lipides. (D'après Stadtman, 2004)

Les chaînes latérales des acides aminés sont toutes susceptibles d'être oxydées, particulièrement les groupements thiols des résidus cystéines et méthionines. Or, contrairement aux autres acides aminés, l'oxydation des résidus cystéines et méthionines est réversible. L'oxydation des groupements thiols des résidus cystéines induit généralement la formation de ponts disulfures (lien S-S) intramoléculaires sur une protéine ou intermoléculaires entre deux ou plusieurs protéines. La réduction des ponts disulfures est catalysée par les thiols transférases par l'intermédiaire du GSH ou de la thiorédoxine. D'autre part, l'oxydation des thioéthers des résidus méthionines conduit à un mélange d'isomères R- et S- de résidus méthionines sulfoxydes. La majorité des espèces possèdent deux méthionines sulfoxydes réductases qui réparent respectivement les isomères R- et S- de résidus méthionines sulfoxydes en résidus méthionines normaux (Valko *et al.* 2006). De manière intéressante, différents agents chimiques sont disponibles en recherche qui peuvent servir à

simuler une condition d'oxydation des protéines. Par exemple, le phénylarsine oxyde (PAO) réagit spécifiquement avec les groupements thiols des résidus cystéines vicinales (non éloignés sur la chaînes polypeptidiques) pour former un lien disulfure intramoléculaire stable, comme illustré à la figure 1.11 (Biaglow *et al.* 2006).

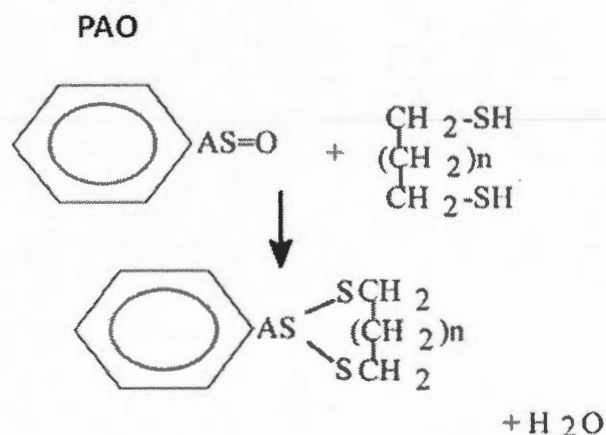
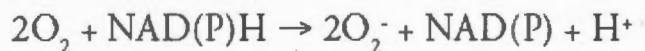


Figure. 1.11 La structure du PAO et son produit de réaction avec les cystéines vicinales. (D'après Biaglow *et al.* 2006)

1.7 La formation de DRO par les NADH/NADPH oxydases

Les NADH/NADPH oxydases sont une famille d'enzymes (Nox1-5 et Duox1/2) associées aux membranes qui catalyse la production de $O_2^{\cdot -}$ par la réduction d'un électron de l' O_2 en utilisant le NADH ou le NADPH comme donneur d'électrons (Elahi *et al.* 2009):



Plusieurs données indiquent que ces enzymes ont une sélectivité plus élevée pour le NADPH (Bedard et Krause, 2007). Leur structure comprend au moins six domaines

transmembranaires et un domaine cytosolique de liaison au FAD et au NADPH (fig. 1.12). Les NADH/NADPH oxydases transporteraient un électron à la fois à partir du NADPH jusqu'au FAD. Ensuite, ceux-ci sont transportés aux groupements hèmes et finalement à l' O_2 . (Brown et Griendling, 2009).

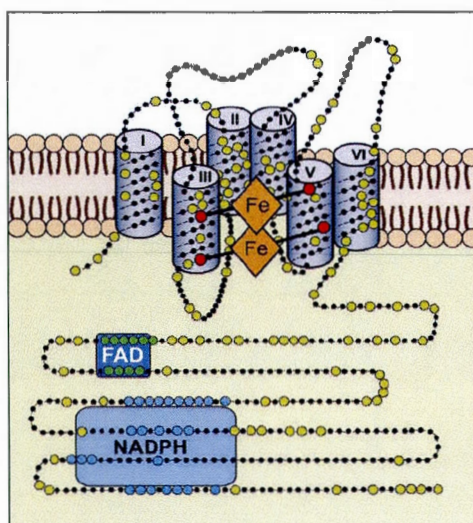


Figure. 1.12 La structure proposée de la région principale des NADPH oxydases. (Tiré de Bedard et Krause, 2007)

Au niveau expérimental, les NADH/NADPH oxydases sont communément inhibées par le chlorure de diphenyleneiodonium (DPI). Cet agent agit en soutirant un électron au niveau d'un transport d'électrons et forme un radical, lequel inhibe les NADH/NADPH oxydases par liaison covalente avec le groupe flavine ou le groupe hème (O'Donnell *et al.* 1993).

Les NADH/NADPH oxydases remplissent diverses fonctions physiologiques et physiopathologiques à travers la génération de DRO. Par exemple, la NADPH oxydase des phagocytes (Nox2) produit de grande quantité de DRO lorsque ceux-ci ingèrent des bactéries pathogènes. Dans ce contexte, le H_2O_2 est convertie, par l'action de la myéloperoxydase, en acide hypochloreux (HOCl). Ce dernier peut réagir avec le $O_2^{\cdot -}$ (ou le Fe^{2+}/Cu^+) et former le

$\cdot\text{OH}$. L' HOCl , de concert avec le $\cdot\text{OH}$, sont très toxiques pour les bactéries et entraînent leur destruction (Nordberg et Arnér, 2001). Sous sa forme inactive, Nox2 est associée à p22^{phox} (fig. 1.13). Nox2 est ensuite activé par l'interaction avec p22^{phox} , les sous-unités cytosoliques de p47^{phox} phosphorylée, p67^{phox} , p40^{phox} , et les petites protéines Rho liant le GTP, soit Rac 1 ou 2. Nox2 est aussi présent et actif dans les cellules non phagocytaires (Brown et Griendling, 2009). Par exemple, Nox2 est activé dans les cellules microgliales du cerveau par les fragments amyloïdes β 40 et 42 ($\text{A}\beta_{40/42}$) produits par les neurones (Qin *et al.* 2005).

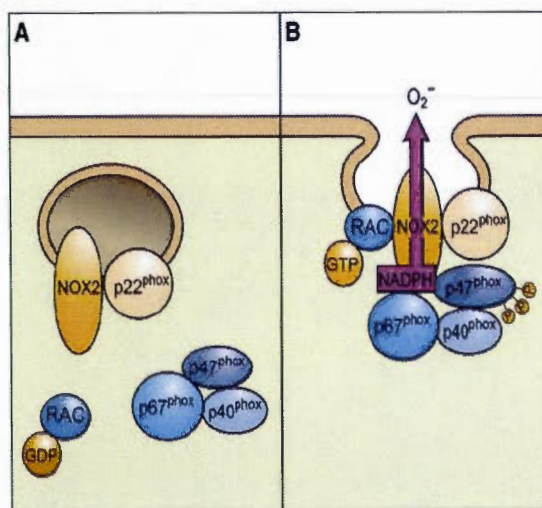


Figure 1.13 Assemblage et activation de Nox2 au niveau des membranes de vésicules intracellulaires chez les neutrophiles. (Tiré de Bedard et Krause, 2007)

Les NADH/NADPH oxydases sont plus fortement exprimées au niveau du colon (Nox1), des phagocytes (Nox2), de l'oreille interne (Nox3), des reins et des vaisseaux vasculaires (Nox4), de tissu lymphoïde et du testicule (Nox5), et finalement au niveau de la glande thyroïde (Duox1/2) (Bedard et Krause, 2007). Les NADH/NADPH oxydases ont aussi été identifiées dans plusieurs régions du système nerveux central (Sorce et Krause, 2009). En se basant sur les niveaux d'ARNm et les niveaux de protéines, Nox2 serait prédominant dans le cerveau, (Cheng *et al.* 2001; Bedard et Krause, 2007). Au niveau cellulaire, les NADH/NADPH oxydases ont été identifiées dans les cultures primaires d'astrocytes (Nox1),

les cellules microgliales (Nox2) et les cellules d'astrocytomes humain (Nox4). Nox4, qui a la particularité d'être activée de façon constitutive, a été détecté dans les neurones par RT-PCR, par immunohistochimie, et par hybridation *in situ* (Cheng *et al.* 2001; Sorce et Krause, 2009; Vallet *et al.* 2005). Le rôle des NADH/NADPH oxydases dans les maladies neurologiques fait le sujet de recherches intenses. Par exemple, il a été rapporté que les cellules microgliales sont activées dans certaines régions du cerveau de patients schizophréniques (Steiner *et al.* 2008).

1.8 La formation de DRO par la chaîne mitochondriale de transport d'électrons

Le premier rôle des mitochondries est la synthèse d'ATP (phosphorylation oxydative) qui est dépendante de la chaîne de transport d'électrons. Celle-ci est composée de cinq complexes protéiques situés à la membrane interne mitochondriale. Les électrons du complexe I, qui proviennent de la réduction équivalente du NADH (cycle de Krebs), sont transférés aux complexes III puis IV, et à l'O₂ qui est finalement réduit en molécule d'H₂O (fig. 1.14). L'énergie libérée durant le transfert d'électron au niveau des complexes I, III et IV sert à pomper les H⁺ de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, ce qui génère un gradient électrochimique de H⁺ à la membrane interne mitochondriale. L'ATP est ensuite synthétisée par la dissipation du gradient de H⁺ à travers le complexe V (Fukui et Moraes, 2008).

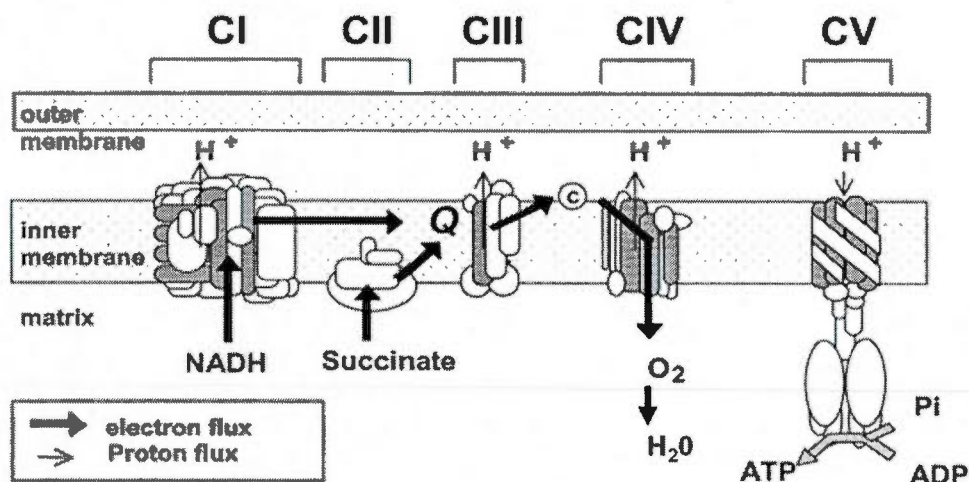


Figure. 1.14 La chaîne de transport d'électrons. (D'après Rötig et Munnich, 2003)

Au cours du transfert d'électrons, principalement au niveau des complexes I et III, une fraction (0.4% à 5%) d'entre eux est perdue et réagit avec l'O₂ pour former le O₂⁻ qui, à son tour, va générer des DRO. Ce processus est responsable de la majorité des DRO produits par les mitochondries et peut conduire à une production de DRO supérieure à celle du cytosol. Les mitochondries seraient ainsi plus vulnérables face aux stress oxydatifs. Par exemple, on observe que le niveau d'oxydation de la guanosine est plus élevé sur l'ADN mitochondriale en comparaison à l'ADN nucléaire (Reddy, 2008).

Les DRO générés par la chaîne de transport d'électrons peuvent induire des mutations sur l'ADN mitochondrial (fig. 1.15). Ces mutations mitochondriales, qui semblent être indicateur du vieillissement cellulaire, entraînent le dysfonctionnement de la chaîne de transport d'électrons. L'augmentation des DRO qui s'ensuit contribue aux dommages à l'ADN mitochondrial, et vice versa. Les DRO sont aussi impliqués dans la modulation des voies de signalisation au niveau du cytosol et du noyau. Elles peuvent aussi activer directement ou

indirectement les voies apoptotiques et nécrotiques, contribuant ainsi au vieillissement et à l'apparition de maladies (Murphy, 2009; Reddy, 2008).

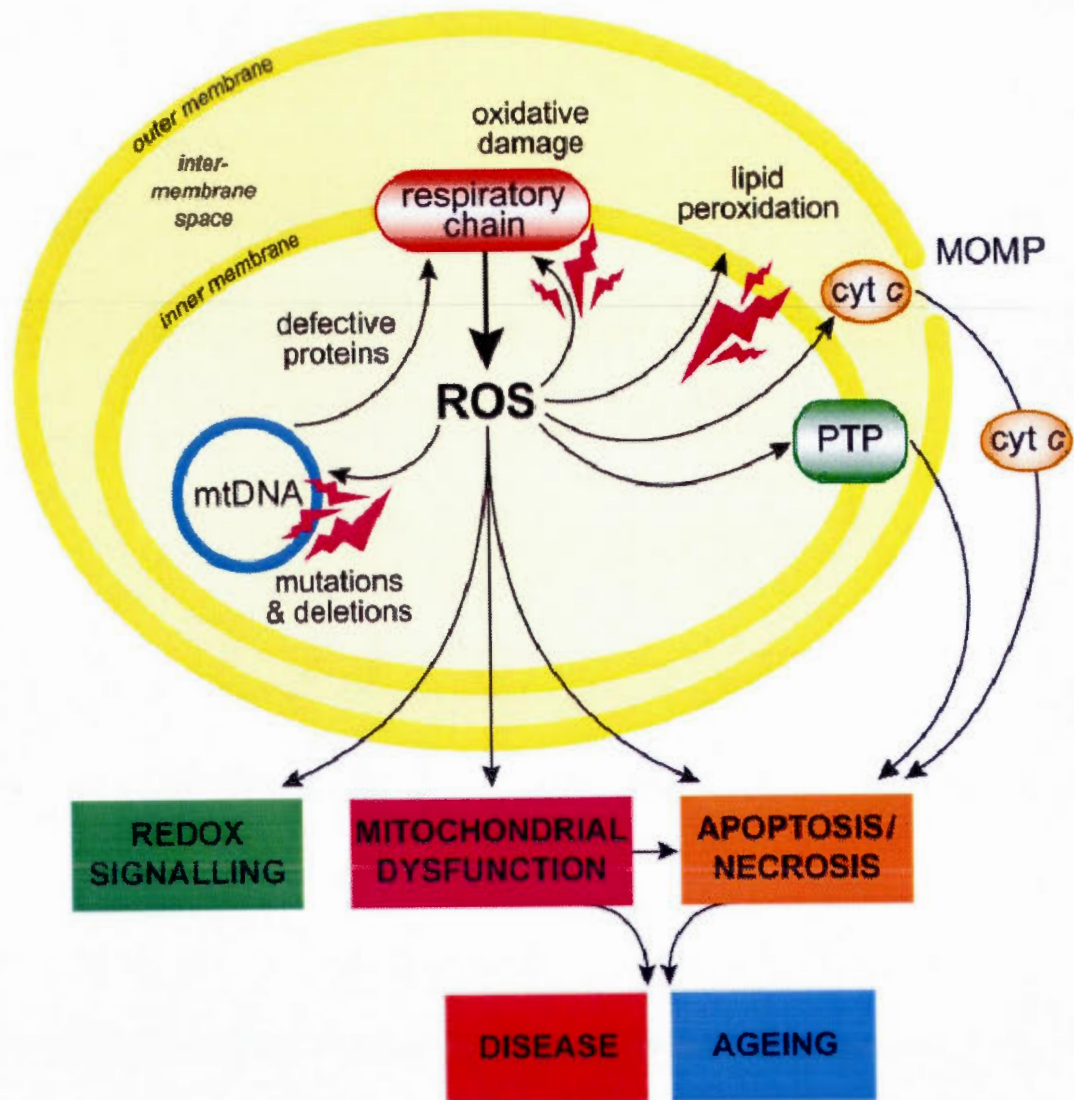


Figure. 1.15 La production des DRO par la chaîne mitochondriale de transport d'électrons. (Tirée de Murphy, 2009)

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle du dysfonctionnement de la chaîne de transport d'électrons dans le développement de maladies neurologiques (Reddy, 2008; Waldbaum et Patel, 2010). Des changements biochimiques associés à la trisomie 21 (syndrome de Down), tels que l'accumulation intracellulaire de la forme insoluble du peptide amyloïde β , peuvent être reproduits par le traitement des cellules cérébrales avec le cyanure m-chlorophenylhydrazone ou CCCP (Busciglio *et al.* 2002). Le CCCP agit en tant qu'agent découplant des mitochondries, c'est-à-dire qu'il induit la dissipation du gradient de proton indépendamment de la synthèse d'ATP.

Le CCCP est aussi un inhibiteur du potentiel membranaire mitochondrial (PMM). Le PMM est connu pour être un excellent indicateur de la fonction mitochondriale car il reflète le gradient électrochimique de H^+ à la membrane interne mitochondriale et l'activité de synthèse d'ATP (de Arriba *et al.* 2006; Waldbaum et Patel, 2010). Le CCCP peut induire la formation de DRO lorsqu'employé à des concentrations variant de 1 μM à 50 μM (Chaudhari *et al.* 2008; Cui *et al.* 2010). Le mécanisme par lequel le CCCP induit les DRO est encore mal connu, mais il semble que le CCCP pourrait lier les protéines de la chaîne de transport d'électrons, en particulier le cytochrome c oxydase ou complexe IV (Bona *et al.* 1993; Cui *et al.* 2010). Ainsi, en inhibant le PMM tout en augmentant la formation de DRO, le CCCP agit comme un perturbateur de la fonction mitochondriale.

1.9 Objectifs de la recherche

Au niveau physiologique les DRO sont générés à de faibles concentrations par des sources intracellulaires telles que la NADH/NADPH oxydase et la chaîne mitochondriale de transport d'électron. Or, aucune étude n'a encore examiné l'effet des DRO produit à l'intérieur de la cellule sur l'expression de la PIMT. Étant donné que les DRO peuvent endommager les protéines en induisant la formation de résidus L-isoaspartates, nous avons émis l'hypothèse que la PIMT serait induite par les DRO produits physiologiquement afin de prévenir la formation de résidus L-isoaspartates sur les protéines. Ainsi, l'objectif général de cette thèse était de déterminer le rôle des DRO produit à l'intérieur de la cellule sur

l'expression et l'activité de la PIMT. Pour ce faire, nous avons utilisé les modèles de cellules en culture de tumeurs cérébrales, soit les U87 (astrocytome) et les SH-SY5Y (neuroblastome). Le choix de ces modèles cellulaires découle du fait que la PIMT est majoritairement exprimée et active dans le tissu cérébral. Or, il existe des liens de plus en plus évidents entre la PIMT et certains désordres cérébraux. Par ailleurs, le cerveau est particulièrement vulnérable aux dommages résultant d'une augmentation du niveau des DRO (stress oxydatif). En conséquence, les DRO sont reconnus comme des cibles thérapeutiques dans plusieurs maladies neurodégénératives. De manière spécifique, l'objectif de cette thèse était de déterminer de nouvelles propriétés de la PIMT à travers sa régulation par les DRO.

Tout d'abord, nous avons démontré que l'augmentation du niveau de DRO intracellulaire stimule l'expression de la PIMT. Par la suite, nous avons mis en évidence que la NADH/NADPH oxydase semble être la source de DRO impliquée dans l'induction de la PIMT lors d'un traitement avec le PAO. Après avoir inhibé le niveau d'expression de la PIMT par la technologie du siRNA, nous avons démontré, de manière convaincante, que la formation des DRO était significativement accrue. Ensemble, ces résultats ont démontré la régulation de la PIMT par les DRO et la forte possibilité que la PIMT puisse agir indirectement comme une protéine antioxydante.

Afin de caractériser davantage le rôle des DRO sur l'expression et l'activité de la PIMT, nous avons investigué les mécanismes qui régulent la PIMT associée aux mitochondries. Étant donné que les mitochondries sont les principales sources de DRO dans la cellule, nous avons émis l'hypothèse que ces derniers réguleraient son expression au niveau mitochondrial. Effectivement, nous avons mis en évidence que la PIMT, généralement considéré comme une protéine cytosolique et monomérique, est exprimée sous des formes monomériques, dimériques et multimériques dans les fractions mitochondriales. Nos résultats démontrent aussi que la perturbation mitochondriale par le CCCP inhibe l'expression et l'activité des monomères de PIMT alors qu'à l'inverse, elle stimule l'expression et l'activité des multimères de PIMT. Nous avons démontré que la multimérisation de la PIMT associée aux mitochondries était due à la formation de ponts disulfures entre les monomères de PIMT. De plus, nous avons trouvé que l'activité catalytique des multimères de PIMT était dépendante

des liens disulfures qu'elles possèdent, indiquant pour la première fois un nouveau mécanisme de régulation de l'expression ainsi que de l'activité de la PIMT.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel

La lignée cellulaire U87 (astrocytome) a été obtenue de American Type Culture Collection (Manassas, VA) tandis que celle de SH-SY5Y (neuroblastome) a été obtenue de European Collection of Cell Cultures (Salisbury, UK). Le PAO, le DPI et le cocktail d'inhibiteurs de protéases proviennent de Calbiochem (La Jolla, CA). La cycloheximide, le N-éthylmaléimide (NEM), le dithiothréitol (DTT), le 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DCNB), le N-acétylcystéine (NAC), le tert-butylhydroperoxide (TBHP), le L-buthionine-sulfoximine (BSO), le CCCP, l'AdoMet, l'AdoHcy, la benzonase et l'iodure de propidium ont tous été obtenus de Sigma-Aldrich (Oakville, ON). L'acide ascorbique provient de EMD Chemicals (Gibbstown, NJ). Les sondes 2',7'-dichlorofluorescein diacétate (DCHF-DA) et rhodamine 123 (Rh123) proviennent de Molecular Probes (Burlington, ON). Le kit d'isolation des mitochondries a été obtenu de Thermo Scientific (Rockford, IL). Le peptide DSIPisoD ou «(*β -Asp5*)-delta-sleep inducing peptide» provient de Bachem (Torrance, CA). Le [^3H]-AdoMet a été obtenu de PerkinElmer (Montréal, QC). L'agent de transfection Lipofectamine a été obtenu d'Invitrogen (Burlington, ON). Le siRNA témoin (fluorescein conjugate)-A provient de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Le siRNA témoin (AllStars negative control), les siRNA contre la thiorédoxine réductase 1 (TrxR1) et la PIMT proviennent de Qiagen (Valencia, CA). L'anticorps polyclonal de lapin contre la PIMT (27 kDa) a été produit et purifié par l'Institut de recherche en biotechnologie (Montréal, QC). Les anticorps polyclonaux de lapin contre l' α -tubuline (52 kDa) provient de Cell Signaling Technology (Danvers, MA) et celui contre la TrxR1 (58 kDa) provient de Santa Cruz

Biotechnology. L'anticorps monoclonal de lapin contre le cytochrome c a été obtenu d'Epitomics (Burlingame, CA).

2.2 Méthodes

2.2.1 Culture cellulaire et traitements

La culture cellulaire a été effectuée dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂ à 37 °C. Les cellules U87 ont été cultivées dans le milieu essentiel minimal (MEM : Hyclone Laboratories, Logan, UT) dans lequel on a ajouté du sérum de veau fœtal à une concentration finale de 10% et 10 mM de pyruvate de sodium. Les cellules SH-SY5Y ont été cultivées dans un mélange 1:1 du milieu essentiel minimal de Dulbecco et du milieu F12 de Ham (DMEM/F12 : Hyclone Laboratories) dans lequel on a ajouté 10% de sérum de veau fœtal. Les cellules U87 (2×10^5) ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits, cultivées pendant 48 heures, et traitées avec le PAO, la cycloheximide, le NEM, le DTT, le DCNB, le NAC, le DPI ou le TBHP. Les cellules SH-SY5Y (4×10^5) ont étéensemencées de la même manière et traitées avec le BSO, le CCCP ou l'acide ascorbique. La présence de diméthylsulfoxyde (DMSO) et d'éthanol était de 0.1% pour toutes les expériences.

2.2.2 Préparation des lysats cellulaires

À la fin des traitements, les cellules U87 et SH-SY5Y ont été lavées à deux reprises avec un tampon phosphate salin (PBS) [NaCl 150 mM, KCL 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,3 mM, 8,1 mM Na₂HPO₄•7H₂O à pH 7,4] froid ne contenant ni Ca²⁺ ni Mg²⁺. Les cellules U87 ont ensuite été grattées dans un tampon de lyse CHAPS froid (CHAPS 1%, NaCl 300 mM, EDTA 1mM, Tris-HCl 50 mM à pH 7.4). Les cellules SH-SY5Y ont été grattées dans un tampon de lyse RIPA froid (NP-40 1%, sodium déoxycholate 0.5%, SDS 0.1%, NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM à pH 7.5) ou un tampon de lyse NP-40 froid (NP-40 1%, glycérol 5%, NaCl 140 mM, Tris-HCl 25 mM à pH 7.5). Les tampons de lyse contenaient un cocktail d'inhibiteurs de protéases et les inhibiteurs de phosphatases fluorure de sodium (1 mM) et orthovanadate de sodium (1 mM). Les lysats de cellules ont été transférés dans un tube et laissés sur glace

pendant 10 à 20 minutes, puis centrifugés à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants ont été récupérés et conservés à -40°C ou -70°C.

2.2.3 Purification de la fraction mitochondriale

Les cellules SH-SY5Y (2×10^6) ont été centrifugées à 850 g et les culots cellulaires ont été récupérés afin de purifier les fractions mitochondriales et solubles selon la méthode décrite par la trousse d'isolation des mitochondries. Cette méthode permet d'éliminer jusqu'à 50% des protéines lysosomales et peroxysomales. Les culots de mitochondries ont été lysés dans un tampon CHAPS-SDS (CHAPS 2%, SDS 0.1%, NaCl 150 mM, Tris-HCl 25 mM à pH 7.2) froid contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases et les inhibiteurs de phosphatases tels que décrits ci-haut. Les lysats ont été centrifugés à 12 000 g pendant 2 min et les surnageants ont été conservés à -70°C. Dans certaines expériences, afin d'optimiser la solubilisation des protéines des fractions mitochondriales, les culots ont été vigoureusement agités dans un tampon Hepes (glycérol 5%, NaCl 25 mM, Hepes-KOH 10 mM à pH 7.4) contenant 3.6 unités/ μ l de benzonase (une nucléase pour digérer l'ADN mitochondrial), un cocktail d'inhibiteurs de protéases et les inhibiteurs de phosphatases. Les suspensions mitochondriales ont été incubées à température ambiante pendant 5 minutes. Ensuite, les suspensions mitochondriales ont été lysées dans un tampon Hepes contenant du SDS à 2% et de l'iodoacétamide à 100 mM. Ce dernier est un agent qui lie de façon covalente les groupements thiols des cystéines et bloque ainsi la formation des ponts disulfures. La lyse des suspensions mitochondriales a été effectuée sous agitation moyenne à température ambiante pendant 10 minutes. Les lysats de protéines ont été congelés et conservés à -70°C. Un cocktail d'inhibiteurs de protéases et les inhibiteurs de phosphatases ont aussi été ajoutés aux fractions solubles. L'iodoacétamide a été omis dans les expériences impliquant les mesures d'activité de la PIMT.

2.2.4 Mesures des DRO, du PMM et de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux

Les cellules U87 ont été cultivées pendant 48 heures puis marquées avec la sonde DCHF-DA à 10 μ M pendant 30 minutes. Le DCHF-DA pénètre les cellules où il est hydrolysé par

les estérases en DCHF (non fluorescent). En présence de DRO, le DCHF est oxydé en DCF (fluorescent). Les cellules ont été lavées à deux reprises dans du MEM plus sérum puis incubées dans du MEM plus sérum contenant soit du DMSO (témoin), du PAO à 5 μ M, ou du TBHP à 100 μ M pendant 20 minutes. Dans certaines expériences, les cellules ont été préalablement incubées avec 5 mM de NAC pendant 60 min et marquées avec le DCHF-DA durant les 30 dernières minutes. Dans d'autres expériences, les cellules ont été marquées avec le DCHF-DA pendant 30 minutes et traitées avec 8 μ M de DPI durant les 20 dernières minutes. Alternativement, ces cellules ont été lavées à deux reprises dans du MEM plus sérum puis incubées pendant 20 minutes dans du MEM plus sérum contenant du NAC, du DPI, à la fois du PAO et NAC ou à la fois du PAO et DPI.

Les cellules SH-SY5Y ont été traitées avec le BSO ou le CCCP, lavées à deux reprises dans du DMEM/F12 plus sérum puis incubées dans le même milieu en présence de DCHF-DA (10 μ M) à température ambiante pendant 5 minutes. Alternativement, les cellules ont été incubées en présence de Rh123 à 2 μ M à température pièce pendant 5 minutes. Le Rh123 est une sonde fluorescente qui se concentre dans les mitochondries de cellules vivantes à cause du PMM. Par contre, le Rh123 est rejetée des cellules lorsque le PMM chute.

Subséquentement, les milieux ont été aspirés et les cellules (U87 et SH-SY5Y) ont été lavées brièvement dans du PBS contenant de la trypsine-EDTA (trypsine porcine 0.5 g/l et EDTA 0.2 g/l) afin d'éliminer toute trace de milieu de culture. On a ensuite ajouté le PBS contenant de la trypsine-EDTA et procédé au détachement des cellules à l'obscurité à température pièce. La trypsine a été neutralisée en rajoutant du PBS contenant de l'albumine sérique bovine 1%. Ensuite, les cellules ont été transférées dans un tube conçu pour la cytométrie en flux et centrifugées à 1000 g pendant 5 minutes. Les cellules ont été remises en suspension dans 250 μ l de MEM plus sérum (U87) ou 250 μ l de DMEM/F12 plus sérum (SH-SY5Y) et directement analysées par cytométrie en flux. L'iodure de propidium (2 μ M) a été ajouté aux cellules à l'instant d'effectuer l'analyse pour évaluer la viabilité cellulaire. Les données ont été récoltées avec un FACS Calibur cytomètre en flux (BD Biosciences, Mississauga, ON) et analysées avec le logiciel WinMDI 2.9. La fluorescence du DCF et

Rh123 a été collectée en FL1 tandis que celle de l'iodure de propidium a été collectée en FL2.

2.2.5 Transfection des cellules avec un siRNA contre la TrxR1 et la PIMT

100 000 cellules U87 ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits et cultivées pendant 24 heures dans du milieu MEM avec sérum. Ensuite, le milieu cellulaire a été remplacé par du milieu MEM avec sérum frais. Parallèlement, des mélanges de transfection ont été préparés en se référant au protocole du fournisseur (Invitrogen). Ceux-ci contenaient un volume de milieu MEM, d'agent de transfection Lipofectamine plus le siRNA témoin (fluorescein conjugate)-A, le siRNA témoin (AllStars negative control), le siRNA contre la TrxR1 ou le siRNA contre la PIMT. Les mélanges ont été ajoutés aux cellules de façon à ce que la concentration finale soit de 20 nM pour le siRNA témoin (fluorescein conjugate)-A, le siRNA contre la TrxR1, et 40 nM pour le siRNA témoin (AllStars negative control), le siRNA contre la PIMT. Après 48 heures, les cellules transfectées avec le siRNA témoin (fluorescein conjugate)-A ont servi à évaluer l'efficacité de transfection à l'aide d'un microscope à fluorescence. Les cellules transfectées avec les autres siRNA ont été lysées dans un tampon CHAPS froid et les surnageants ont été récupérés comme décrit ci-haut.

2.2.6 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide et électrotransfert

Les échantillons de protéines ont été dosés selon la méthode micro-BCA de Pierce (Rockford, IL). Ensuite, des quantités égales (20-40 µg) de protéines ont été préparées dans un tampon d'échantillon (glycérol 10%, SDS 2%, β-mercapto-éthanol 5%, bleu de bromophénol 0.00625%, Tris-HCl 62.5 mM à pH 6.8), chauffés à 100°C pendant 4 minutes et mis sur gel de polyacrylamide selon la méthode de Laemmli (1970). Les gels de séparation contenaient 12.5% (p/v) d'acrylamide et 0.3% (p/v) N,N'-méthylène-bis-acrylamide, 0.375 M de Tris-HCl à pH 8.8, 0.1% de SDS, 1 µl/ml de N,N,N',N',-tétraméthyléthylènediamine (TEMED), et 0.5 mg/ml de persulfate d'ammonium (APS). Les gels d'entassement contenaient 3.8% d'acrylamide et 0.1% N,N'-méthylène-bis-acrylamide, 0.125 M de Tris-HCl à pH 6.8, 0.1% de SDS, 1 µl/ml de TEMED et 0.5 mg/ml d'APS. La migration a débuté

à 100 V pendant 30 minutes et s'est poursuivie à 150 V jusqu'à ce le bleu de bromophénol arrive au bas du gel. Alternativement, les protéines ont été préparées dans un tampon d'échantillon en présence et en absence de β -mercapto-éthanol et séparées sur gels contenant plutôt 10% (p/v) de polyacrylamide en conditions réductrices et non réductrices, respectivement. Dans ces conditions expérimentales, les échantillons n'ont pas été chauffés.

Après l'électrophorèse, le gel d'entassement a été excisé et les protéines prises dans le gel de séparation ont été transférées sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF) de 0.45 μ m de porosité. Alternativement, le transfert des protéines a été effectué en incluant aussi le gel d'entassement. Les transferts ont duré 60 min avec un voltage variant de 12 à 25 V par gel dans un tampon contenant de la glycine 96 mM, du Tris 10 mM et du méthanol 10%. Suite au transfert, les membranes PVDF ont été incubées à température pièce pendant 1 h dans un tampon Tris salin (TBS) de blocage (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM à pH 7.5) contenant 0.1% de Tween-20 et 5% de lait en poudre.

2.2.7 Immunodétection des protéines par buvardage Western

Par la suite, les membranes PVDF ont été lavées 2 fois pendant 10 minutes dans un tampon TBS contenant 0.3% de Tween-20. Puis, les membranes PVDF ont été incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires dilués dans une solution de TBS contenant 0.1% de Tween-20 à 1 :200 000 pour la PIMT ou dans une solution de TBS contenant 0.1% de Tween-20 et 3% de BSA à 1 :1000 pour l' α -tubuline et la TrxR1; à 1 :200 pour le cytochrome c. Ensuite, les membranes PVDF ont été lavées 3 fois pendant 15 minutes dans un tampon TBS contenant 0.3% de Tween-20 et incubées durant 1 heure à température pièce avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase dilués à 1 :2500 dans du TBS contenant 0.1% de Tween-20 et 5% de lait en poudre. Les anticorps secondaires de lapin ont été utilisés contre la PIMT, l' α -tubuline, la TrxR1 et le cytochrome c. Finalement, les membranes PVDF ont été incubées pendant 1 minute dans une solution de signal de chimiluminescence et exposées sur des films Hyclone pour immunodétecter les protéines d'intérêt.

2.2.8 Électrophorèse 2-D

Les protéines provenant des lysats cellulaires (50 µg) et des fractions mitochondriales (22 µg) ont été diluées dans 8 M d'urée, 2 M de thiourée, 2% de CHAPS, 0.3 % de DTT, 2% d'ampholytes pH 4-7 (GE Healthcare) avec du bleu de bromophénol et incubées toute la nuit à température ambiante en présence de Immobiline DryStrips (GE Healthcare) avec un intervalle de pH 4 à 7. La focalisation isoélectrique a été effectuée en plusieurs étapes (1 min à 200 V, 90 min d'un gradient linéaire de 200 à 3500 V et finalement 65 min à 3500 V) à 20°C avec un Multiphor II apparatus (GE Healthcare). Après la migration des protéines en première dimension, les «strips» ont été équilibrées dans du Tris-HCl 0.5 M à pH 6.8, urée 6 M, glycérol 30 %, SDS 2% et DTT 2% pendant 15 min, puis Tris-HCl 0.5 M à pH 6.8, urée 6 M, glycérol 30 %, SDS 2% et iodoacétamide 4% avec du bleu de bromophénol pendant 10 min. Les «strips» équilibrées ont été déposées au dessus d'un gel de polyacrylamide 12.5% et recouvert de 0.5% d'agarose. On a ensuite procédé à l'électrophorèse suivie de l'électrotransfert et de l'immunodétection de la PIMT par buvardage Western.

2.2.9 Essai de méthylation de la PIMT dans les gels de polyacrylamide

Les protéines des fractions mitochondriales ont été séparées en conditions non réductrices tel que décrit ci-haut. Par la suite, des sections préalablement sélectionnées du gel ont été excisées et placées dans des cuvettes de methacrylate qui ont ensuite été remplies avec 500 µl de tampon Triton X-100 (Triton X-100 1%, Hepes-Tris 0.7 M à pH 7.2) pour renaturer les protéines. Alternativement, les cuvettes contenant les morceaux de gel ont été remplies avec 500 µl de Hepes-Tris 0.7 M à pH 7.2 en présence de 2% DTT pendant 15 min afin de briser les ponts disulfures des protéines. Puis, 1 ml de Hepes-Tris 0.7 M à pH 7.2 en présence de 4% d'iodoacétamide a été ajouté aux cuvettes pendant 15 min. Les morceaux de gel ont ensuite été lavés avec 1 ml de Hepes-Tris 0.7 M à pH 7.2 et les cuvettes ont été remplies avec 500 µl du tampon Triton X-100. Des cuvettes ne contenant que le tampon Triton X-100 ont servi de témoins. La renaturation des protéines s'est déroulée à température ambiante durant toute la nuit. Subséquemment, les morceaux de gel ont été modérément agités et incubés à 37°C pendant 30 min. Les essais enzymatique de la PIMT ont débuté par l'ajout de

12.4 μ l de mélange réactionnel (Hepes-Tris à pH 7.2 100 mM, DSIPisoD 1 mM, AdoMet 9.4 μ M, [3 H]-AdoMet 1 μ Ci) aux morceaux de gel, qui ont été modérément agité et incubés à 37°C pendant 90 min. Le DSIPisoD est un peptide synthétique utilisé pour mesurer l'activité catalytique de la PIMT dans les fractions mitochondriales. Similairement, les résidus aspartates anormaux dans les morceaux de gel de protéines mitochondriales séparées par électrophorèse ont été évalués par l'ajout de la PIMT recombinante de *Drosophila melanogaster* (généreusement offerte par Dr C.M. O'Connor, «*Boston College*») dans du Hepes-Tris à pH 7.2 100 mM, AdoMet 9.4 μ M, [3 H]-AdoMet 1 μ Ci. Des milieux réactionnels sans DSIPisoD et sans PIMT recombinante ont servi de contrôle. Les réactions ont été arrêtées par l'addition de 170 μ l d'AdoHcy à une concentration finale de 4 mM. Les morceaux de gels ont été agités et mis sur glace. Ensuite, les cuvettes ont été insérées dans des vials à scintillation en présence de 10 ml de liquide de scintillation. Puis, 682 μ l de NaOH 0.2 N/SDS 1% a été ajouté aux cuvettes pour hydrolyser les groupements [3 H]-méthyles esters au niveau du peptide synthétique DSIPisoD et au niveau des protéines mitochondriales modifiées par des résidus aspartates anormaux. Les vials ont été encapsulés pour laisser le [3 H]-méthanol diffusé dans la phase organique (liquide à scintillation) pendant 24 h. La radioactivité a été mesurée avec un compteur à scintillation.

2.2.10 Analyses statistiques

Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. L'analyse densitométrique des protéines a été effectuée avec le logiciel TotalLab TL100 v2006 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK). Les moyennes et les écarts-types ont été déterminés avec le logiciel GraphPad Prism 5. Les analyses statistiques ont été réalisées selon la méthode du test de Student.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 L'expression de la PIMT est stimulée par le PAO

Le PAO est un dérivé de l'arsenic qui réagit avec les groupements thiols des cystéines vicinales (peu éloignées sur la séquence polypeptidique) pour former un lien disulfure intramoléculaire stable (Biaglow *et al.* 2006). Afin d'étudier la relation entre l'expression de la PIMT et l'oxydation des protéines, la lignée cellulaire d'astrocytomes humains U87 a été utilisée comme modèle. L'analyse par buvardage Western a montré que l'expression de la PIMT est fortement stimulée après 20 min de traitements avec le PAO en fonction de sa concentration (fig. 3.1a). La PIMT a déjà atteint le niveau d'expression maximal à 5 μ M de PAO. Cette concentration a ainsi été utilisée pour les expériences subséquentes. Nous avons aussi obtenus des résultats similaires avec le modèle cellulaire SH-SY5Y de neuroblastomes humains (annexe I : fig. 1.1). Étant donné que le PAO a en plus la propriété d'inhiber les tyrosines phosphatases, il pourrait stimuler l'expression de la PIMT par l'inhibition de ces phosphatases. Cependant, le traitement des cellules U87 avec un inhibiteur spécifique des tyrosines phosphatases n'a pas entraîné l'augmentation de l'expression de la PIMT (annexe I : fig. 1.2).

Par la suite, les cellules ont été traitées avec ce dérivé de l'arsenic après les avoir préalablement incubées avec la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse des protéines. La figure 3.1b montre que la cycloheximide prévient significativement la stimulation de l'expression de la PIMT par le PAO, indiquant que l'induction de la synthèse des protéines a principalement contribué à l'augmentation du niveau d'expression de la PIMT par le PAO.

3.2 L'induction de la PIMT est dépendante de la propriété du PAO à réagir avec les cystéines vicinales

Dans le but de démontrer la relation entre l'induction de l'expression de la PIMT et l'oxydation des protéines au niveau des groupements thiols des cystéines vicinales par le PAO, les cellules U87 ont été traitées avec ce dernier en présence de NEM, un agent qui lie et modifie spécifiquement les thiols, et de DTT, un agent réducteur des thiols mais qui peut aussi interagir avec le PAO (Stocken et Thompson, 1946). Il a été rapporté que le NEM et le DTT peuvent en effet prévenir les effets du PAO (Korge *et al.* 2001). Tel qu'attendu, l'expression de la PIMT a été fortement et significativement induite par le PAO (fig. 3.2a). De plus, le NEM seul a entraîné la diminution de l'expression de la PIMT tandis que le DTT seul a faiblement augmenté l'expression de la PIMT. De manière importante, lorsqu'on a traité les cellules avec le NEM préalablement au PAO, l'induction de la PIMT a été abolie de manière significative et le niveau d'expression de la PIMT était similaire à celui mesuré lors du traitement avec le NEM seul. D'un autre côté, la pré-incubation avec le DTT a aussi inhibé l'induction de la PIMT par le PAO. Toutefois, on observe un effet moins frappant du DTT qui pourrait être attribué à la formation d'un complexe instable avec le PAO (Rokutan *et al.* 2000) ou à la cytotoxicité vu qu'il a causé une diminution du niveau d'expression de l' α -tubuline. Dans l'ensemble, ces résultats supportent l'idée que l'induction de l'expression de la PIMT par le PAO est causée par les protéines possédant des cystéines vicinales.

Un candidat qui pourrait être impliqué dans la stimulation de la PIMT par le PAO est la thiorédoxine réductase. En fait, des études ont démontré que les dérivés de l'arsenic incluant le PAO peuvent lier et inhiber la thiorédoxine réductase à travers ses cystéines vicinales (Pallis *et al.* 2003; Rengby *et al.* 2004). La thiorédoxine réductase fait partie de la défense antioxydante de la cellule. Elle catalyse principalement la réduction des ponts disulfures sur la thiorédoxine (Arnér *et al.* 1999). Elle peut aussi réduire les ponts disulfures sur certaines autres protéines tout en participant à la réduction de petites molécules oxydantes comme le H_2O_2 (Nordberg et Arnér, 2001). De plus, des études antérieures ont rapporté que le PAO peut inactiver la thiorédoxine réductase sans pour autant affecter l'activité des enzymes antioxydantes glutarédoxine et glutathion réductase (Biaglow *et al.* 2006). Il a aussi été

montré que le PAO diminue faiblement le GSH cellulaire, mais à des concentrations 10 à 20 fois supérieure à celle (5 μ M) utilisée au cours de notre étude (Biaglow *et al.* 2006; Mendiratta *et al.* 1998). Basé sur ces observations, nous avons décidé d'investiguer l'implication de la thiorédoxine réductase 1 (TxR1) sur l'induction de l'expression de la PIMT par le PAO. L'isoforme TxR1 est principalement exprimée dans le cytosol (Gladyshev *et al.* 1996; Zhong *et al.* 1998). Alors, on a premièrement procédé aux traitements avec le DCNB, un inhibiteur reconnu de la thiorédoxine réductase (Arné *et al.* 1995). La figure 3.2b montre que la DCNB n'a pas affecté l'expression de la PIMT. Pour confirmer ce résultat, on a ensuite transfecté les cellules U87 avec des siRNA contre la TxR1. Tel que révélé à la figure 3.2c, l'inhibition marquée de l'expression de la TxR1 par quatre siRNA différents n'a pas stimulé celle de la PIMT. Les résultats avec le DCNB et les traitements aux siRNA suggèrent clairement que l'induction de la PIMT par le PAO n'est pas associée à la thiorédoxine réductase.

3.3 L'expression de la PIMT est stimulée par la formation des DRO induits par le PAO

Puisque la stimulation de l'expression de la PIMT par le PAO semble être indépendante de la TxR1, une enzyme de la défense antioxydante des cellules, on a considéré la possibilité que cet effet soit plutôt associé au déclenchement d'une réponse pro-oxydante par le PAO. Pour examiner cela, on a tout d'abord mesuré la production des DRO dans les cellules traitées avec le PAO, malgré que ce dernier n'ait jamais été rapporté pour induire les DRO. En se servant de la sonde DCHF, qui devient fluorescente (DCF) en fonction du niveau intracellulaire de DRO, on a trouvé que le PAO induit significativement la formation de DRO dans les cellules U87 (fig. 3.3a et 3.3b). Afin de valider cet effet, les cellules ont été incubées avec les antioxydants NAC et DPI avant les traitements au PAO. Le NAC est un chélateur de DRO mais avant tout employé pour augmenter le niveau intracellulaire en GSH, lequel est un antioxydant majeur de la cellule (Valko *et al.* 2007; Konarkowska *et al.* 2005). Le DPI, d'un autre côté, est un inhibiteur de la NADH/NADPH oxydase qui est une source importante de DRO (Babior *et al.* 2002; Turcotte *et al.* 2003). Tel que montré aux figures 3.3a et 3.3b, le NAC seul a diminué partiellement la formation des DRO par rapport au témoin, ce qui

corrèle avec sa fonction antioxydante. Ajouté aux cellules avant le traitement au PAO, le NAC a bloqué la formation des DRO induits par le PAO. Étonnamment, le DPI a causé l'induction significative des DRO. Ce résultat est toutefois en accord avec l'étude menée par Riganti et al. (2004). Par contre, le DPI a inhibé significativement la formation des DRO induites par le PAO. Comme attendu, le contrôle positif TBHP a conduit à une augmentation de l'intensité de la fluorescence du DCF. La viabilité cellulaire est demeurée constante sous toutes ces conditions, indiquant que ces résultats ne sont pas associés à un accroissement de la mort cellulaire. De manière convaincante, l'ensemble de ces résultats ont démontré que la PAO est un inducteur de DRO.

Ayant démontré que le PAO induit en effet les DRO dans les cellules U87, on a ensuite examiné s'il pouvait stimuler l'expression de la PIMT par l'intermédiaire de ce mécanisme. D'une part, on a confirmé que le PAO augmente significativement l'expression de la PIMT (fig. 3.3c). Ensuite, on a montré que l'expression de la PIMT n'est pas affectée par les traitements avec le NAC et le DPI seuls. De manière importante, la stimulation de l'expression de la PIMT a été significativement bloquée quand le NAC ou le DPI a été ajouté préalablement au PAO. Ces résultats ont démontré clairement que l'expression de la PIMT est induite par les DRO.

3.4 L'inhibition du niveau d'expression de la PIMT accroît la formation des DRO induits par le PAO

Dans l'objectif de déterminer le rôle de la PIMT dans la formation des DRO par le PAO dans les cellules U87, nous avons inhibé son expression par siRNA et par la suite traité ces cellules avec le PAO. Comme attendu, la figure 3.4a et 3.4b montre que la formation des DRO est stimulée dans les cellules transfectées avec un siRNA témoin et ensuite traitées avec le PAO. Significativement, le niveau de formation de DRO par le PAO est nettement plus élevé dans les cellules transfectées avec le siRNA contre la PIMT que celui observé dans les cellules transfectées avec le siRNA témoin. Ces résultats ont démontré qu'une chute d'expression de la PIMT accroît la formation des DRO par le PAO. De nouveau, la viabilité cellulaire est restée constante sous ces conditions expérimentales. La figure 3.4c montre que

le PAO a induit moins l'expression de la PIMT dans les cellules transfectées avec le siRNA contre la PIMT par rapport aux cellules témoins, soutenant que l'amplification de la formation des DRO est principalement due à l'incapacité de stimuler la synthèse de la PIMT. Ces résultats nous ont mené à conclure que la PIMT joue un rôle antioxydant dans la cellule.

3.5 Le BSO, un inhibiteur de la synthèse du GSH, stimule l'expression de la PIMT dans les cellules de neuroblastomes

Les neurones ont un système de défense antioxydante qui prévient les dommages causés par le stress oxydatif. Une population de neurones, tels que ceux présents dans la région de l'hippocampe CA1), demeure toutefois vulnérable aux stress oxydatifs en raison de divers facteurs, par exemple, une faible production d'ATP et une perturbation mitochondriale (Wang et Michaelis, 2010). Le GSH est un antioxydant majeur de la cellule. Une baisse du niveau de GSH a été associée à plusieurs désordres neurologiques (Lu, 2009). Afin de caractériser davantage la régulation de la PIMT par les DRO, nous avons premièrement incubé les cellules de neuroblastomes SH-SY5Y avec le BSO, un inhibiteur du glutamate cystéine ligase, soit l'enzyme qui participe à la première étape de la synthèse du GSH (Lee *et al.* 2008). L'analyse par buvardage Western a montré que l'expression de la PIMT est stimulée après 6 h d'incubation en fonction de la concentration de BSO (fig. 3.5). On a constaté que l'augmentation de l'expression de la PIMT était maximale et significative à 1000 μ M de BSO. À cette concentration, le BSO n'a pas entraîné de changement significatif dans l'expression de la PIMT à 1 h et 3 h (résultats non montrés). Le niveau d'expression du contrôle négatif, l' α -tubuline, est demeuré constant durant les expériences avec le BSO.

3.6 L'expression de la PIMT est induite dans les fractions mitochondriales lors d'une perturbation mitochondriale

Le GSH est majoritairement situé dans le cytosol. Les mitochondries et le réticulum endoplasmique représentent des réservoirs minoritaires du GSH (Lu, 2009). Plusieurs études soutiennent que c'est la baisse du niveau de GSH mitochondrial qui contribue principalement à l'induction d'un stress oxydatif. Or, les mitochondries sont les plus importantes sources de

DRO et dépendent du GSH pour maintenir leur défense antioxydante. La déplétion en GSH dans les mitochondries peut perturber l'activité mitochondriale et augmenter la production de DRO (Merad-Boudia *et al.* 1998). Le CCCP est un inhibiteur spécifique des mitochondries et est largement utilisé pour perturber l'activité mitochondriale. Dans cette optique, on a ensuite décidé d'investiguer l'effet de la perturbation mitochondriale puisque celle-ci est associée à la formation des DRO (Chaudhari *et al.* 2008). Tout d'abord, nous avons suivi la perturbation mitochondriale par la perte du PMM et l'augmentation des DRO dans les cellules SH-SY5Y. La figure 3.6a montre que le CCCP a diminué significativement le PMM tandis que son niveau de variation avec le BSO n'était pas statistiquement significatif. De plus, le CCCP a significativement induit la production de DRO, comparativement au BSO qui a entraîné une faible mais significative augmentation des DRO (fig. 3.6b). La viabilité cellulaire n'a pas été affectée par ces agents (résultats non montrés), indiquant que la perturbation mitochondriale n'est pas due à une baisse de la viabilité cellulaire en accord avec les résultats rapportés par Lim *et al.* (2001).

La PIMT a essentiellement été caractérisée comme une enzyme cytosolique quoiqu'elle fût détectée dans les mitochondries (Desrosiers et Fanélus, 2011; Taylor *et al.* 2003). Dans le même ordre d'idée, nous avons traité les cellules SH-SY5Y avec le CCCP et le BSO et évalué l'effet de ces agents sur l'expression de la PIMT par immunobuvardage Western des protéines de la fraction mitochondriale. De manière marquée, le CCCP a induit une forte et significative augmentation de la PIMT dans les fractions mitochondriales (fig. 3.6c). Des résultats similaires ont été observés avec le BSO (fig. 3.6d). Le cytochrome c, une protéine exclusivement localisée aux mitochondries en condition normale, n'a pas été significativement modulé lors des traitements au CCCP et au BSO (fig. 3.6e). D'ailleurs, le cytochrome c n'a pas été détecté dans les fractions solubles (fig. 3.6e). Ces résultats ont démontré clairement que la perturbation mitochondriale par le CCCP a induit l'expression de la PIMT associée aux mitochondries.

3.7 Les fractions mitochondriales contiennent deux isoformes spécifiques de la PIMT

Afin de caractériser davantage la PIMT associée à la fraction mitochondriale, nous avons procédé à leur analyse par électrophorèse 2-D (fig. 3.7). Comme attendu, le lysat cellulaire a montré une forme majeure de la PIMT à 27 kDa ayant un point isoélectrique (pI) d'environ 4.4. De manière intéressante, la fraction mitochondriale a révélé deux isoformes de la PIMT migrant à 27 kDa avec des valeurs de pI d'approximativement 4.7 et 4.9. Leur niveau d'expression était inférieur à celui de l'isoforme de la PIMT présente dans le lysat cellulaire. Ces résultats indiquent que la fraction mitochondriale contient deux isoformes spécifiques de la PIMT lesquelles sont moins acides que l'isoforme de la PIMT retrouvée dans le lysat cellulaire. Ceci suggère que la PIMT retrouvée dans la fraction mitochondriale fonctionnerait différemment de la PIMT cytoplasmique. En plus, l'immunodétection de la PIMT dans le lysat cellulaire et dans la fraction mitochondriale a révélé une protéine à 57 kDa avec un pI d'à peu près 5.8, suggérant la possibilité d'un dimère de la PIMT dans la lignée cellulaire de neuroblastomes.

3.8 La perturbation mitochondriale par le CCCP déclenche la formation de multimères de PIMT dans les mitochondries

Étant donné que la PIMT associée aux mitochondries semble différente de celle retrouvée dans les lysats cellulaires, nous avons décidé d'investiguer l'effet des DRO sur son expression lors d'une perturbation mitochondriale. Pour ce faire, nous avons effectué des traitements avec l'agent CCCP et séparé les protéines solubles et mitochondriales par électrophorèse en conditions non-réductrices. Dans les fractions solubles, les monomères de la PIMT ont diminué de façon marquée en fonction du temps (fig. 3.8a). Par ailleurs, un faible signal d'immunodétection d'une protéine qui correspondrait possiblement aux dimères de PIMT a été détecté dans les fractions solubles (fig. 3.8a). D'autre part, le CCCP a induit une diminution rapide des monomères de PIMT dans les fractions mitochondriales (Fig. 3.8b). De manière intéressante, des multimères de la PIMT ont été détectés par l'anticorps au niveau du gel d'entassement. Après 1 h d'incubation avec le CCCP, la quantité des multimères de PIMT ont fortement augmenté pour atteindre un niveau maximal entre 3 et 6

h. Inversement, on constate que les multimères de PIMT sont absents sur les gels réducteurs, indiquant que ceux-ci résultent de la formation de ponts disulfures (fig. 3.8c). Parallèlement, le niveau d'expression des monomères de la PIMT est stimulé par le CCCP sur les gels réducteurs, supportant la possibilité que les multimères de PIMT sont formés de monomères liés par des ponts disulfures (fig. 3.8c). De plus, les dimères de PIMT étaient les formes majeures de la PIMT dans les fractions mitochondriales (fig. 3.8b). Toutefois, en condition réductrice, l'expression de ces dimères de PIMT était considérablement diminuée et une autre protéine immunoréactive a été observée à environ 97 KDa (fig. 3.8c). Le traitement au CCCP n'a pas induit de changement significatif dans le niveau d'expression des dimères de PIMT et de la protéine immunoréactive à 97 KDa sur les gels réducteurs (fig. 3.8c). Tout bien considéré, ces résultats indiquent que la perturbation mitochondriale par le CCCP stimule la formation de multimères de PIMT associée aux mitochondries qui est dépendante de l'oxydation des groupements thiols des résidus cystéines en ponts disulfures. Cependant, les données concernant les dimères de PIMT et la protéine immunoréactive à 97 KDa suggèrent que des facteurs autres que la formation de ponts disulfures ont aussi pu contribuer à la multimérisation de la PIMT.

3.9 La formation des multimères de PIMT est prévenue par l'acide ascorbique

L'acide ascorbique (vitamine C) est un antioxydant dont la concentration la plus élevée est retrouvée au cerveau (Harrison et May, 2009). Il peut pénétrer librement les cellules SH-SY5Y et protéger les mitochondries contre les DRO (May *et al.* 2006; KC *et al.* 2005). Afin de démontrer de manière convaincante que la formation des multimères de PIMT est dépendante de la formation des DRO, les cellules ont été incubées au préalable avec 300 μ M d'acide ascorbique pendant 1 h puis soumises aux traitements avec 1 μ M de CCCP durant 6 h. La figure 3.9a montre que la chute du niveau d'expression des monomères de PIMT est bloquée par l'acide ascorbique dans les fractions solubles. Similairement, dans les fractions mitochondriales, l'acide ascorbique a significativement inhibé la diminution des monomères de PIMT induite par le CCCP (fig. 3.9b). Les traitements avec l'acide ascorbique n'ont pas eu d'effet significatif sur le niveau d'expression des monomères de PIMT dans les fractions solubles (fig. 3.9a). Par contre, l'acide ascorbique a significativement augmenté l'expression

des monomères de PIMT dans les fractions mitochondriales (fig. 3.9b). D'autre part, dans les fractions mitochondriales, le CCCP a induit une forte et significative augmentation de l'expression des multimères de PIMT. L'acide ascorbique seul n'a pas eu d'effet sur les quantités de multimères de PIMT mais a significativement prévenu la formation des multimères de PIMT induite par le CCCP. Cela dit, ces résultats ont supporté le mécanisme par lequel les DRO ont diminué le niveau des monomères de PIMT dans les fractions solubles et mitochondriales, et concomitamment ont favorisés la formation de multimères de PIMT dans les fractions mitochondriales.

3.10 La perturbation mitochondriale augmente la quantité de résidus aspartates endommagés sur les protéines avec un poids moléculaire élevé

Il a été rapporté que les DRO peuvent accroître la quantité de résidus L-isoaspartates anormaux sur les protéines membranaires (Ingrosso *et al.* 2000). Dans le but de confirmer si la perturbation mitochondriale conduit à une augmentation du niveau de résidus aspartates endommagés, les protéines mitochondriales ont été séparées en conditions non réductrices et les gels ont été découpés en sections de 1 cm. Chacune des sections des gels a été individuellement évaluée pour son contenu en résidus aspartates anormaux par l'incorporation du groupement [^3H]-méthyle radioactif. Tel que montré à la figure 3.10, le CCCP n'a pas significativement changé le niveau des résidus aspartates anormaux totaux présents dans l'ensemble des protéines migrant dans les gels de séparation plus celles trouvées dans les gels d'entassement. Des résultats similaires ont été observés quand l'incorporation du groupement [^3H]-méthyle a été mesurée directement dans les lysats mitochondriaux provenant des cellules témoins et les cellules traitées au CCCP (résultats non montrés). En revanche, le CCCP a significativement augmenté le niveau de résidus aspartates anormaux sur les protéines mitochondriales de poids moléculaire élevé qui sont restées piégées dans les gels d'entassement. Donc, en dépit du fait que les protéines de haut poids moléculaire séquestrées dans les gels d'entassement représentent une petite partie des protéines des fractions mitochondriales, elles sont celles qui ont accumulé les résidus aspartates anormaux lors de la perturbation mitochondriale par le CCCP.

3.11 Activation des multimères de la PIMT lors de la perturbation mitochondriale par le CCCP

Nous avons ensuite procédé à des essais de méthylation par la PIMT sur des morceaux de gel isolés contenant les formes monomériques, dimériques ou multimériques de PIMT qui ont été préparées à partir des fractions mitochondriales (fig. 3.11a). Comme attendu, l'activité catalytique de la PIMT a été détectée dans la fraction des monomères de PIMT (fig. 3.11b). De manière intéressante, l'activité enzymatique de la PIMT a aussi été détectée dans la fraction des dimères de PIMT ainsi que dans la fraction des multimères de PIMT (fig. 3.11b). Ces observations démontrent que les trois formes de la PIMT reconnues par l'anticorps lors des immunodétections par immunobuvardage Western sont catalytiquement actives dans les fractions mitochondriales. Dans les cellules témoins, le niveau basal d'activité des multimères de PIMT était similaire à celui des monomères de PIMT alors que l'activité des dimères de PIMT est manifestement la plus élevée. Cependant, lorsque les cellules ont été traitées avec le CCCP, l'activité enzymatique des monomères de PIMT a fortement et significativement diminué alors que celle des dimères de PIMT a légèrement diminué mais de façon non significative (fig. 3.11b). À l'inverse, le CCCP a causé une augmentation marquée et significative de l'activité catalytique des multimères de PIMT.

Afin d'investiguer le mécanisme par lequel la formation des ponts disulfures régule l'activité catalytique des multimères de PIMT, les morceaux de gel contenant les multimères de PIMT des cellules témoins et celles traitées au CCCP ont été incubés avec l'agent réducteur DTT suivi des essais de méthylation. La réduction des ponts disulfures par le DTT des multimères de PIMT provenant des cellules témoins a entraîné une hausse significative de son activité, indiquant que la PIMT multimérique est moins active que la PIMT monomérique en condition basale (fig. 3.11b et 3.11c). Une fois de plus on observe une forte et significative augmentation de l'activité des multimères de PIMT à partir des cellules traitées au CCCP (fig. 3.11b et 3.11c). De manière frappante, la rupture des liens disulfures par le DTT a significativement et quasi complètement bloqué l'activité des multimères de la PIMT provenant des cellules traitées avec le CCCP (fig. 3.11c). Ces données suggèrent que le CCCP provoque une modification de la PIMT monomérique associée aux fractions

mitochondriales qui inhibe fortement son activité enzymatique. En somme, ces résultats sont les premiers à démontrer que la perturbation mitochondriale avec le CCCP induit l'assemblage et l'activation enzymatique de la PIMT par la formation de ponts disulfures entre monomères de PIMT dans les fractions mitochondriales.

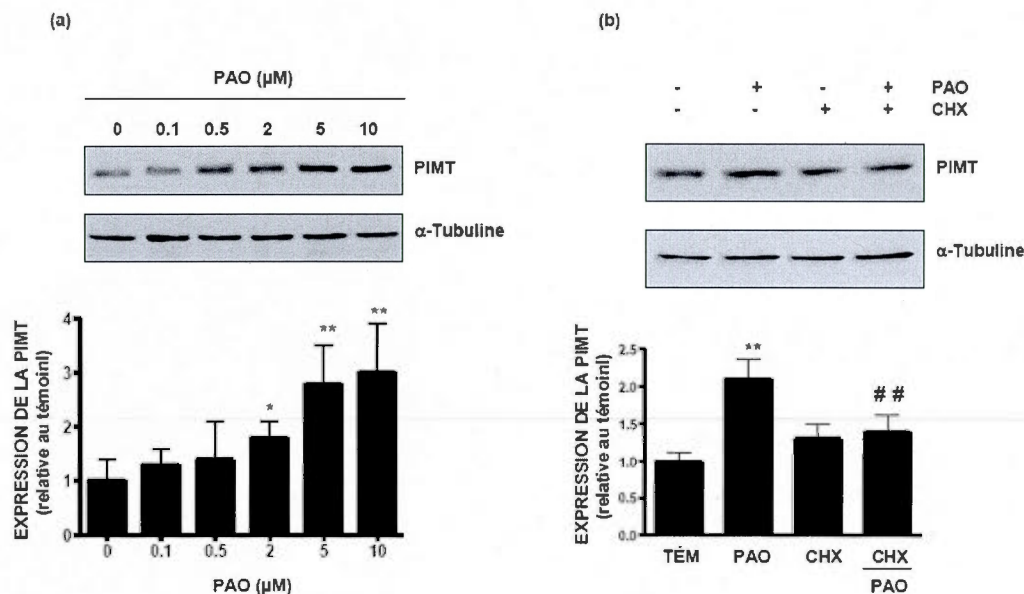


Figure 3.1 Le PAO induit l'expression de la PIMT. (a) Les cellules U87 ont été traitées aux concentrations indiquées de PAO pendant 20 min ou (b) prétraitées avec la cycloheximide (CHX) à 10 μ M pendant 30 min avant d'ajouter le PAO (5 μ M). Les protéines des lysats cellulaires ont été analysées par immunobuvardage de type Western et immunodétectées avec des anticorps spécifiques. L'analyse densitométrique de la PIMT est représentative de trois expériences indépendantes. Les astérisques identifient les valeurs de probabilité plus petites que 0.05 (*) et 0.01 (**), qui sont considérées significativement différentes par rapport aux témoins (PAO = 0; TÈM), tandis que (##) identifie les valeurs de probabilité plus petite que 0.01 qui sont considérées significatives par rapport aux cellules traitées au PAO.

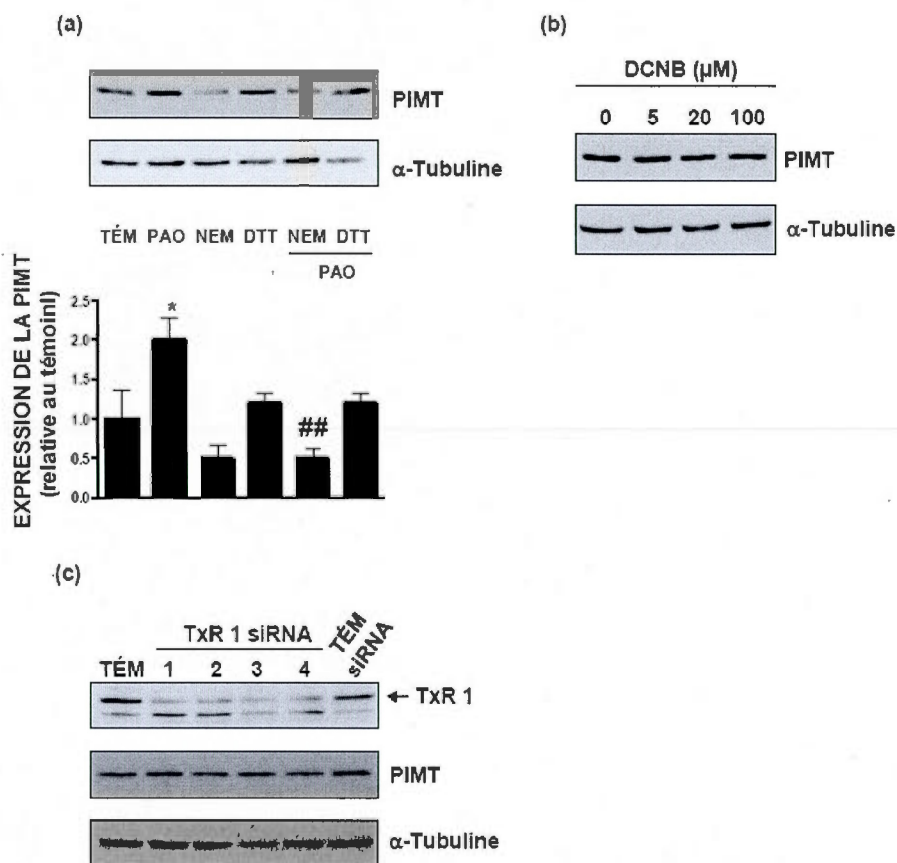


Figure 3.2 La PIMT est stimulée par le PAO en oxydant les résidus cystéines vicinaux indépendamment de la TxR1. (a) Les cellules U87 ont été incubées en présence de DMSO (TÉM) ou traitées avec 50 μ M de NEM, 0.5 mM de DTT et 5 μ M de PAO pendant 20 min. Dans certains cas, le NEM et le DTT ont été ajoutés 5 min avant le PAO ou le DMSO puis incubé pendant 20 min additionnelles. L'expression de la PIMT et de l' α -tubuline dans les lysats cellulaires a été analysée par électrophorèse et immunobuvardage de type Western. Les données et l'analyse densitométrique du niveau d'expression de la PIMT sont représentatives de trois expériences indépendantes. * $P < 0.05$ est considéré significatif par rapport aux cellules traitées au DMSO, et ## $P < 0.01$ est considéré significatif par rapport aux cellules traitées au PAO. (b) Les cellules ont été traitées avec les concentrations indiquées de DCNB pendant 20 min. (c) Les cellules ont été transfectées avec quatre siRNA différents contre la TxR1 et un témoin siRNA (fluorescein conjugué)-A à 20 nM pendant 48 h. Les traitements cellulaires avec le témoin siRNA (fluorescein conjugué)-A ont montré jusqu'à 80% d'efficacité de transfection. Les lysats ont été analysés par buvardage Western avec les anticorps contre la TxR1 (58 kDa), la PIMT (27 kDa) et l' α -tubuline (52 kDa).

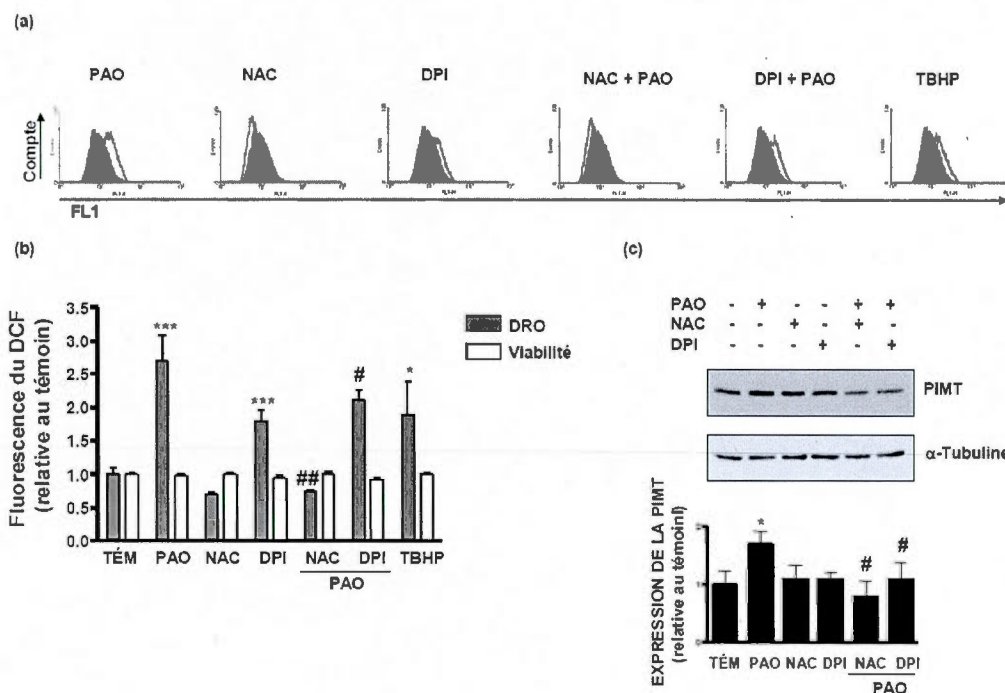


Figure 3.3 La stimulation de la PIMT est dépendante de la formation des DRO induits par le PAO. (a) Les cellules U87 ont été marquées avec le DCHF-DA pendant 30 min puis traitées avec le DMSO (TÉM) ou le PAO (5 μ M), ou le TBHP (100 μ M) pendant 20 min. Le TBHP a été utilisé comme contrôle positif pour la génération intracellulaire de DRO. Les cellules ont été incubées avec le NAC (5 mM) pendant 60 min et le DCHF-DA a été ajouté durant les dernières 30 min. Dans d'autres expériences, les cellules ont été marquées avec le DCHF-DA pendant 30 min et le DPI (8 μ M) a été ajouté pendant les dernières 20 min. Parallèlement, le PAO a été ajouté aux cellules incubées en présence de NAC ou DPI. Suite à ces traitements, les cellules ont été récoltées et immédiatement analysées par cytométrie en flux. Les pics gris représentent les cellules traitées au DMSO alors que les pics blancs correspondent à la fluorescence du DCF générée durant les différents traitements. (b) La représentation en histogramme de la fluorescence du DCF mesurée par cytométrie en flux. La viabilité cellulaire a été évaluée par le marquage avec l'iodure de propidium. (c) Effets des traitements cellulaires avec le NAC et le DPI avant l'addition de DMSO (TÉM) ou de PAO sur l'expression de la PIMT. Les protéines ont été soumises à l'immunobuvardage de type Western, et la PIMT (27 kDa) ainsi que l' α -tubuline (52 kDa) ont été immunodétectées. Les données et l'analyse densitométrique du niveau d'expression de la PIMT sont représentatives de trois expériences indépendantes. * $P < 0.05$ et *** $P < 0.001$ sont considérés significatifs par rapport aux cellules traitées au DMSO, # $P < 0.05$ et ## $P < 0.01$ sont considérés significatifs par rapport aux cellules traitées au PAO.

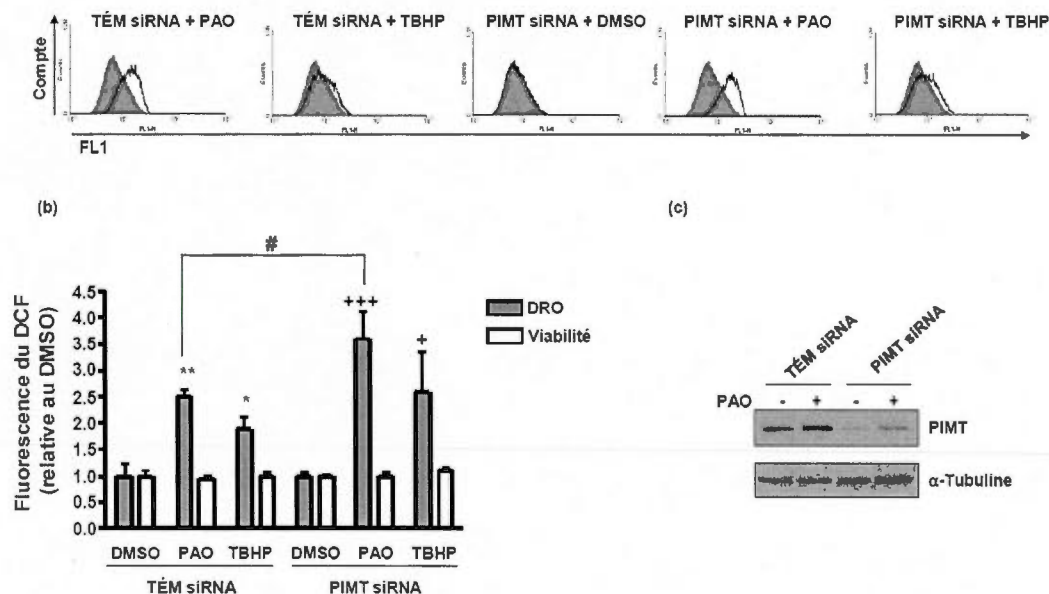


Figure 3.4 La déficience en PIMT augmente le niveau de formation de DRO par le PAO. (a) Les cellules U87 ont été transfectées avec un siRNA contre la PIMT ou avec un «AllStars negative control siRNA» (TÊM siRNA) à 40 nM pendant 48 h. Les cellules ont été ensuite marquées avec le DCHF-DA pendant 30 min, lavées et subséquemment traitées avec le DMSO ou le PAO (5 μ M), ou le TBHP (100 μ M) pendant 20 min. Le TBHP a été utilisé comme contrôle positif pour la génération intracellulaire de DRO. L'analyse par cytométrie en flux a été performée juste après les traitements. Les pics gris représentent les cellules contrôles traitées avec le TÊM siRNA et traitées au DMSO alors que les pics blancs correspondent à la fluorescence du DCF générée durant les différents traitements. (b) L'histogramme montrant l'intensité de fluorescence du DCF pour chaque traitement. La viabilité des cellules a été suivie par le marquage à l'iodure de propidium. * $P < 0.05$ et ** $P < 0.01$ sont considérés significatifs par rapport à TÊM siRNA et les cellules traitées au DMSO, + $P < 0.05$ et +++ $P < 0.001$ sont considérés significatifs par rapport à PIMT siRNA et les cellules traitées au DMSO alors que # $P < 0.05$ identifie les différences significatives entre les cellules transfectées avec le PIMT siRNA et les cellules transfectées avec le TÊM siRNA suivi des traitements avec le PAO. (c) L'analyse par buvardage Western est représentative des cellules transfectées avec un TÊM siRNA ou un PIMT siRNA suivant ou non les traitements avec PAO.

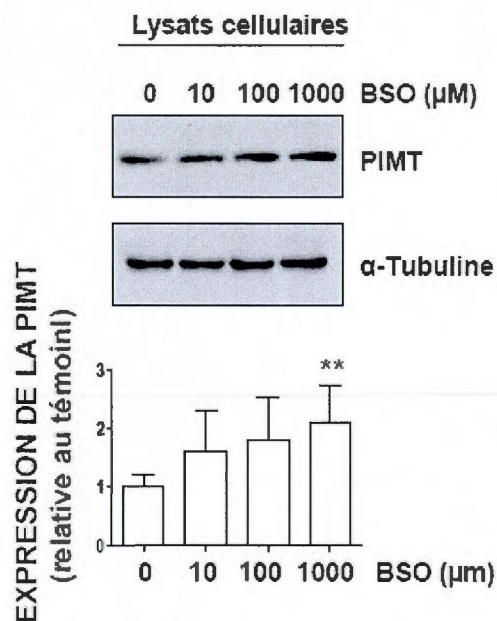


Figure 3.5 Stimulation de l'expression de la PIMT par le BSO. Les cellules SH-SY5Y ont été traitées aux concentrations indiquées de BSO (qui est un inhibiteur de la synthèse du GSH) pendant 6 h. Les protéines provenant des lysats cellulaires ont été analysées par immunobuvardage de type Western et immunodétectées avec des anticorps spécifiques. L'analyse densitométrique de la PIMT est représentative de trois expériences indépendantes. Les astérisques identifient les valeurs de probabilité plus petites que 0.01 (**), qui sont considérées significativement différentes par rapport au témoin (BSO = 0).

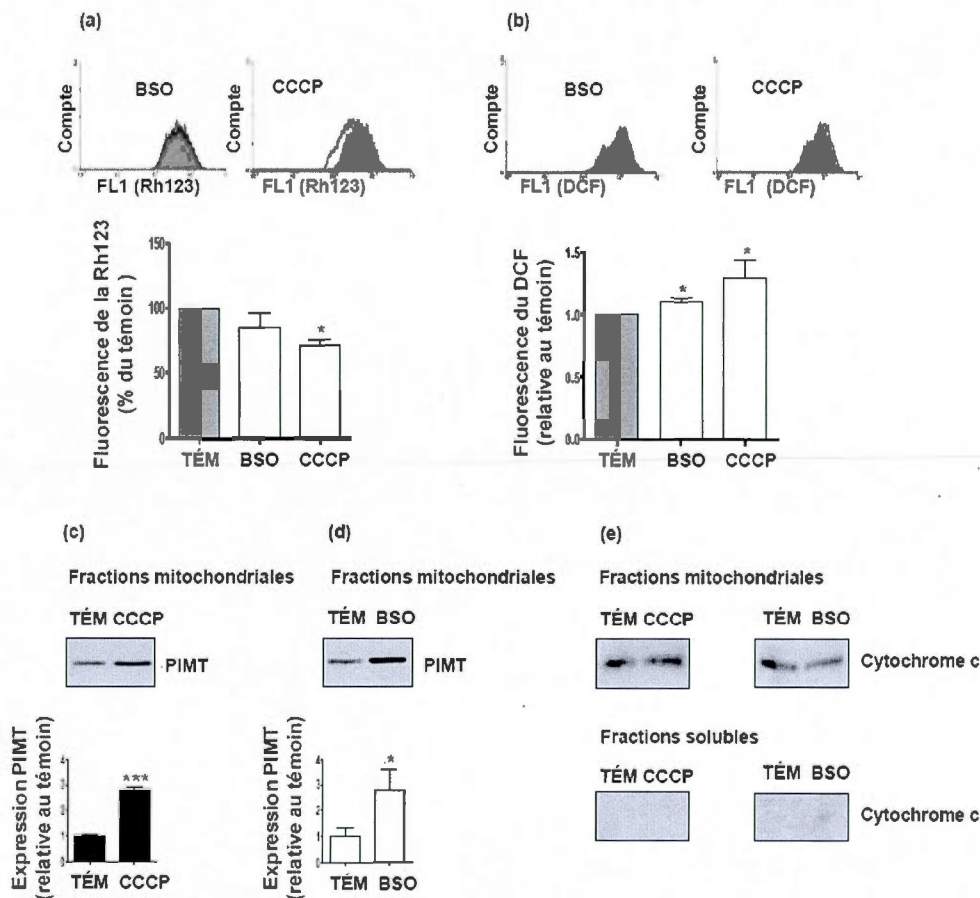


Figure 3.6 La perturbation mitochondriale induit l'expression de la PIMT dans les fractions mitochondriales. Subséquemment aux traitements avec le BSO (1000 μ M) et le CCCP (1 μ M), les cellules SH-SY5Y ont été marquées avec le Rh123 (a) ou le DCHF-DA (b) et immédiatement analysées par cytométrie en flux. Les quantifications de la fluorescence de la Rh123 et du DCF sont les moyennes de trois expériences indépendantes. Les histogrammes sont représentatifs des résultats obtenus par la cytométrie en flux. Les pics gris représentent les cellules témoins (TÉM) alors que les pics blancs correspondent à la fluorescence du DCF générée durant les traitements au BSO et au CCCP. De plus, les fractions mitochondriales ont été préparées à partir des cellules témoins (TÉM) et à partir des cellules incubées avec le CCCP (c) et le BSO (d). Les protéines des lysats mitochondriaux ont été séparées par électrophorèse en présence de SDS puis l'expression de la PIMT (27 kDa) et du cytochrome c (17 kDa) ont été analysée par immunobuvardage de type Western avec des anticorps anti-PIMT et anti-cytochrome c. L'analyse densitométrique du niveau d'expression de la PIMT est représentative de trois expériences indépendantes. * $P < 0.05$ et *** $P < 0.001$ sont considérés significatifs par rapport au témoin.

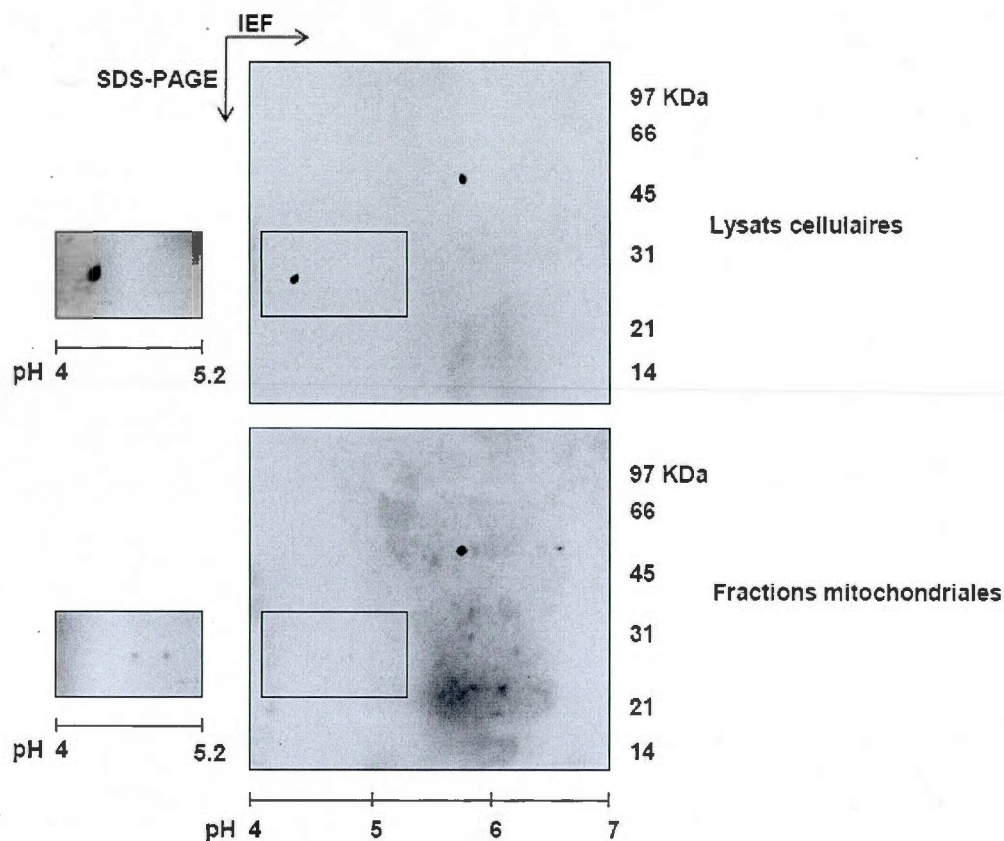


Figure 3.7 Analyse sur gels bidimensionnels de la PIMT associée aux fractions mitochondriales. Les protéines des lysats cellulaires et des fractions mitochondriales ont été séparées par électrophorèse 2D (IEF/SDS-PAGE) et immunodétectées avec un anticorps polyclonal contre la PIMT. Les intervalles de pH (4-7) sont représentés au-dessous et les poids moléculaires des protéines sont représentés à la droite. Les boîtes à la gauche représentent un temps d'exposition de plus longue durée du signal de la PIMT immunodétectée dans la région encadrée des membranes PVDF. Les données sont représentatives de deux expériences effectuées en duplicata.

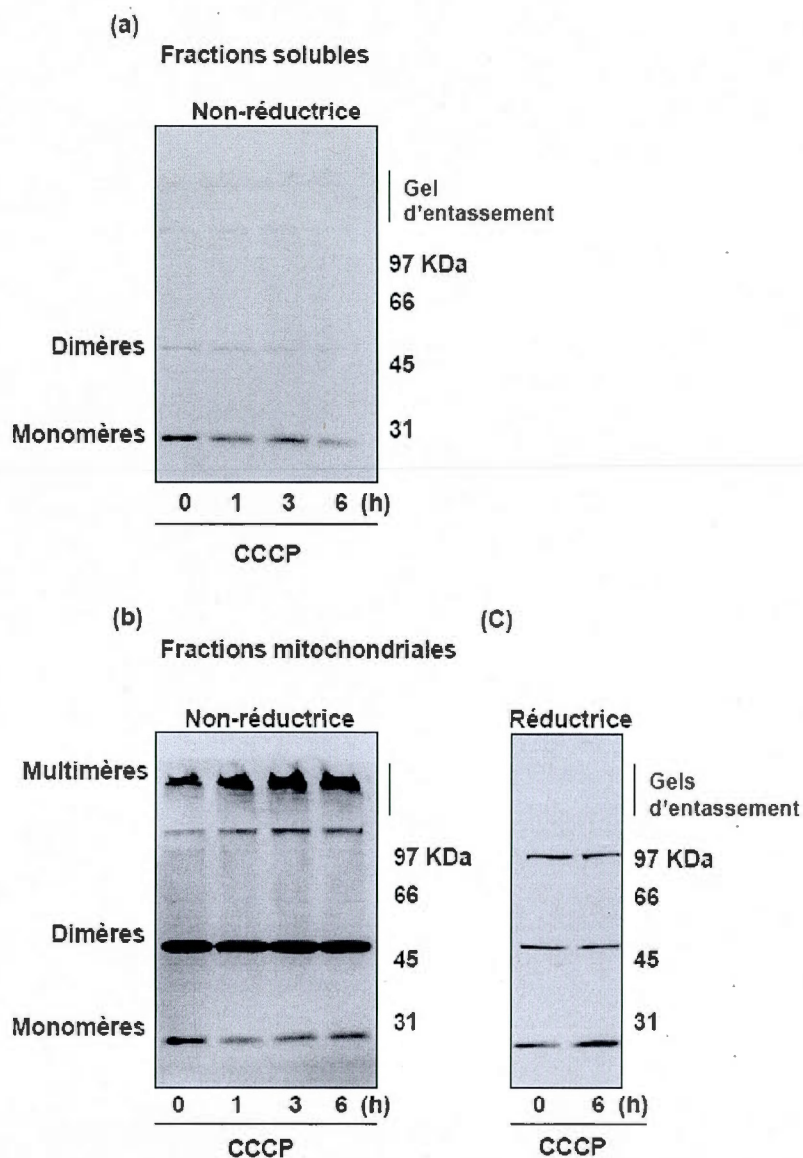


Figure 3.8 Les multimères de PIMT sont formés à partir de monomères liés par des ponts disulfures. (a) Les cellules SH-SY5Y ont été incubées avec 1 μ M de CCCP aux temps d'incubation indiqués et les protéines des fractions solubles ont été séparées par électrophorèse en présence de SDS et en conditions non-réductrices puis immunodétectées en utilisant l'anticorps contre la PIMT. Alternativement, les cellules ont été exposées au CCCP et les protéines des culots de mitochondries ont été analysées de la même façon par électrophorèse en condition non-réductrices (b) et réductrices (c) suivi de l'immunobuvardage de type Western avec un anticorps anti-PIMT. Les données sont représentatives d'expériences effectuées trois fois.

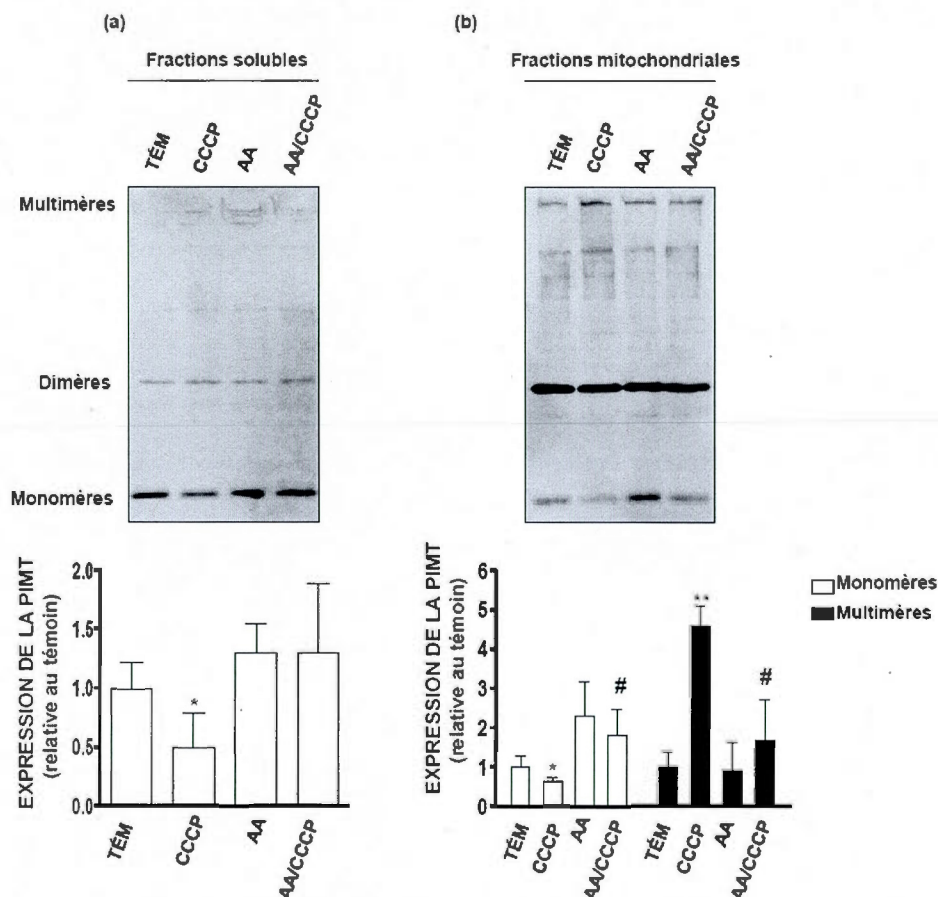


Figure 3.9 L'antioxydant acide ascorbique bloque la formation des multimères de PIMT. (a) Les cellules SH-SY5Y ont été prétraitées en présence ou en absence d'acide ascorbique (AA) à 300 μ M pendant 1 h puis en présence ou en absence de 1 μ M de CCCP pour 6 h additionnelles. Les protéines des fractions solubles (a) et des fractions mitochondriales (b) ont été séparées par électrophorèse en conditions non-réductrices et analysées par buvardage Western avec l'anticorps contre la PIMT. L'analyse densitométrique du niveau d'expression de la PIMT est représentative de trois expériences indépendantes. Les astérisques identifient les valeurs de probabilité plus petite que 0.05 (*) et 0.01 (**), qui sont considérées significativement différentes par rapport aux témoins. #, $P < 0.05$ est considéré significativement différent par rapport aux cellules traitées au CCCP.

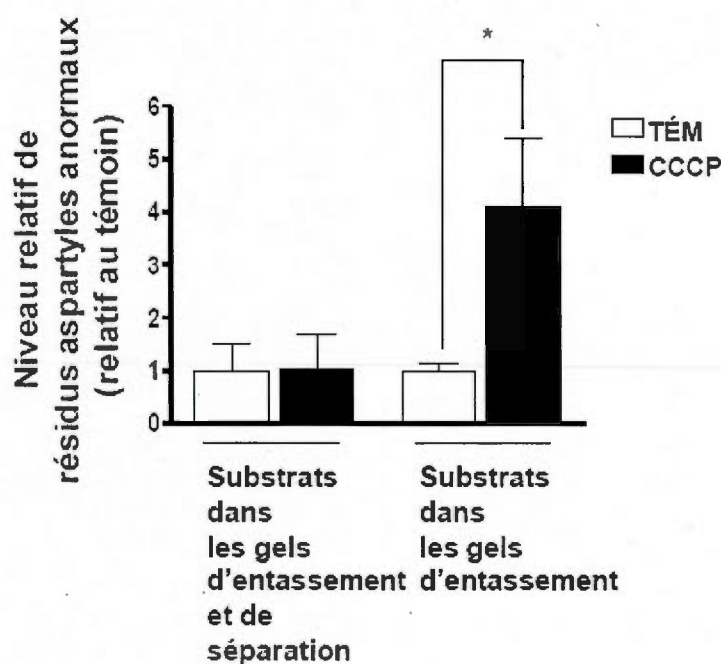


Figure 3.10 Accumulation de résidus aspartates endommagés sur les protéines de poids moléculaire élevé dans les fractions mitochondriales lors d'un traitement avec le CCCP. Les protéines mitochondriales des cellules témoins (TÉM) et celles traitées au CCCP ont été séparées par électrophorèse en présence de SDS et en conditions non réductrices. Les gels non colorés ont été découpés en sections de 1 cm qui ont été individuellement analysées pour leur contenu en résidus aspartates anormaux. L'incorporation du [^3H]-méthyle radioactif au niveau des protéines a été mesurée comme décrit dans le Matériel et Méthodes. Les substrats dans les gels d'entassement et de séparation (les deux colonnes de gauche) correspondent aux groupements [^3H]-méthyles totaux formés dans les protéines séquestrées dans les morceaux de gel d'entassement et dans les morceaux de gel de séparation. Les substrats dans les gels d'entassement correspondent aux protéines acceptant le [^3H]-méthyle situées dans les morceaux de gel d'entassement seulement (les deux colonnes de droite). Les niveaux de résidus aspartates anormaux des protéines mitochondriales des cellules traitées avec le CCCP sont relatifs à ceux mesurés dans les cellules témoins. *, $P < 0.05$ est considéré significativement différent par rapport aux témoins. Ces données sont les moyennes de trois essais d'expériences indépendantes.

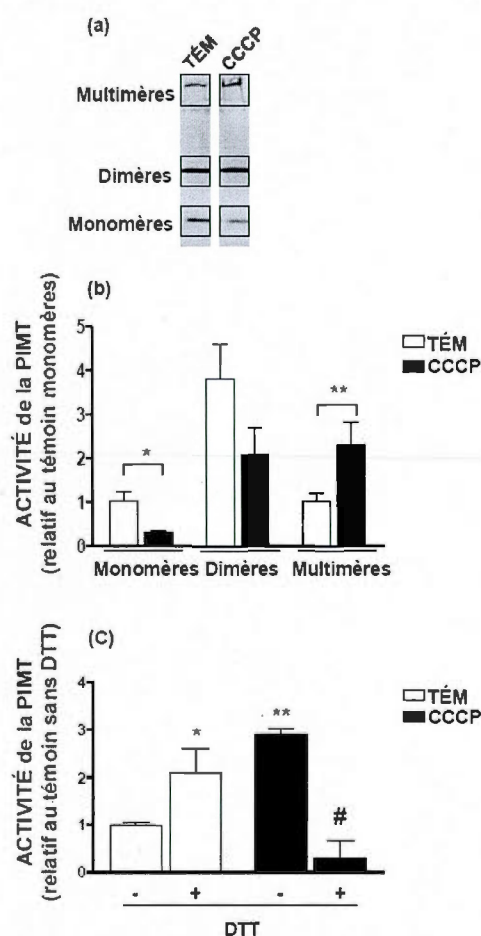


Figure 3.11 La stimulation de l'activité enzymatique des multimères de PIMT induite par le CCCP est dépendante des liens disulfures. Les protéines des lysats mitochondriaux ont été séparées par électrophorèse en présence de SDS et en conditions non réductrices. Les protéines ont été séparées en même temps sur deux gels fait en parallèle. Les protéines du premier gel ont été transférées sur une membrane de PVDF. La position de la PIMT en tant que monomères, dimères et multimères a été localisée par immunobuvardage (a). Dans le second gel, les régions où les diverses formes de la PIMT ont été immunodétectées avec le premier gel ont été découpées comme indiqué par les encadrements. Ces morceaux de gel ont été utilisés pour la mesure de l'activité catalytique de la PIMT (b). Alternativement, les morceaux excisés des gels correspondant aux multimères ont été préincubés avec le DTT pour couper les ponts disulfures des protéines suivi des essais de méthylation par la PIMT (c). L'incorporation du groupement [^3H]-méthyle radioactif provenant de [^3H]-AdoMet sur le substrat isomérisé DSIPisoD a été mesurée comme décrit dans le Matériel et Méthodes. Ces résultats sont les moyennes de trois expériences indépendantes. *, $P < 0.05$ et **, $P < 0.01$ sont considérés significativement différents par rapport aux témoins (TÉM). #, $P < 0.05$ est considéré significativement différent par rapport aux cellules traitées avec le CCCP.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Un des facteurs contribuant aux maladies neurodégénératives est le dommage oxydatif des protéines (Jomova *et al.* 2010). Or, l'effet de l'oxydation des protéines sur l'expression de la PIMT dans le cerveau n'a jamais été étudié. Les groupements thiols des protéines sont plus susceptibles à diverses formes de modification dont l'oxydation (Valko *et al.* 2007). Le PAO est un agent qui oxyde spécifiquement les groupements thiols de résidus cystéines vicinaux, et peut donc servir d'outil pour investiguer l'oxydation des protéines. Dans cette optique, nous avons examiné l'effet de la modification oxydative des protéines avec le PAO sur l'expression de la PIMT dans les cellules U87 (glioblastome). Dans un premier temps, nous avons montré que le niveau d'expression de la PIMT était fortement stimulé (près de 3 fois) après seulement 20 min de traitement avec le PAO. Ce type de régulation a été rapporté pour l'induction de la protéine de stress hème oxygénase par le PAO (Gildemeister *et al.* 2001). À notre connaissance, une induction aussi rapide et intense de l'expression de la PIMT par un agent chimique n'a jamais été décrite.

Une piste qui pourrait contribuer à éclaircir la régulation de la PIMT par le PAO est l'éventualité que cet agent puisse activer la transcription du gène encodant la PIMT (PCMT1). Par exemple, le promoteur de PCMT1 contient deux éléments de réponse aux xénobiotiques et, de manière intéressante, un élément de réponse antioxydante (DeVry *et al.* 1996). Ces données suggèrent que le promoteur de PCMT1 possède les propriétés lui permettant de répondre à un stress cellulaire. Par conséquent, il serait important d'évaluer l'activité du promoteur de PCMT1 après un traitement avec le PAO.

Nous avons démontré que le PAO induit la formation des DRO dans les cellules U87, ce qui est à notre connaissance la première évidence de ce type de réponse des cellules exposées au PAO. De manière frappante, l'augmentation de l'expression de la PIMT par le PAO a été significativement inhibée par le NAC et l'inhibition de la NADH/NADPH oxydase par le DPI, démontrant de manière convaincante que la formation des DRO est responsable de la stimulation de la synthèse de la PIMT par le PAO. Les études antérieures avaient montré, au contraire, que seul le niveau de résidus L-isoaspartates variait en fonction du stress oxydatif (D'Angelo *et al.* 2001; Ingrosso *et al.* 2000; Ingrosso *et al.* 2002). La divergence entre les résultats de la littérature et les nôtres peut s'expliquer par le fait que dans ces études les DRO sont formés dans le milieu extracellulaire (H_2O_2 ou TBHP). Dans notre cas, il apparaît que le PAO induit plutôt la formation de DRO à l'intérieur de la cellule qui vont ensuite stimuler l'expression de la PIMT. En accord avec cela, la formation inattendue de DRO par le DPI n'a pas eu d'effet sur l'expression de la PIMT. Ces observations indiquent que la PIMT est préférentiellement régulée par une source intracellulaire de DRO.

Un candidat intéressant qui expliquerait l'habileté du PAO à stimuler l'expression de la PIMT pourrait être la NADH/NADPH oxydase. Cette enzyme est un générateur de $O_2^{\cdot -}$ et il a été démontré qu'elle contient des cystéines vicinales (Le Cabec et Maridonneau-Parini, 1995). Ceci est en accord avec nos résultats qui démontrent que l'induction de la PIMT par le PAO est significativement prévenue par le NEM, un agent modifiant les groupements thiols. Alors qu'il a été rapporté que le PAO inhibe la NADH/NADPH oxydase, d'autres études ont rapporté que l'effet du PAO sur la NADH/NADPH oxydase était plus complexe (Le Cabec et Maridonneau-Parini, 1995; Janiszewski *et al.* 2000). En effet, il a été montré que le PAO inhibe l'activité NADPH oxydase tandis qu'il augmente significativement l'activité NADH oxydase (Janiszewski *et al.* 2000). Ces observations supportent un modèle par lequel la PIMT serait induite lors de l'activation de la NADH oxydase par PAO. Or, les inhibiteurs des flavoprotéines utilisant le NADH tel que le DPI devraient bloquer cet effet comme démontré dans cette étude. Étant donné la nature non spécifique du DPI, des investigations plus poussées seront requises pour clairement démontrer l'implication de l'activité de la NADH oxydase dans l'induction de la synthèse de la PIMT par l'agent oxydant PAO. Par exemple, on pourrait utiliser un siRNA contre chacune des sous-unités cytosoliques de la

NADH/NADPH oxydase. Par ailleurs, le trioxyde d'arsenic, largement employé dans le traitement de la leucémie promyélocytique (Zhang *et al.* 2001), n'a pas eu d'effet sur l'expression de la PIMT dans les cellules U87 (annexe I : fig. 1.3). Ces données suggèrent que la régulation de la PIMT est spécifique au PAO et n'est pas associée aux différentes molécules modifiées de l'arsenic. Puisque le PAO et le trioxyde d'arsenic partagent le même mécanisme d'action (modification oxydative des cystéines vicinales), on peut émettre l'hypothèse que la stimulation de l'expression de la PIMT est due à la capacité particulière du PAO à activer la NADH oxydase. Tout de même, on ne peut pas éliminer la possibilité que d'autres mécanismes puissent participer à la stimulation de l'expression de la PIMT par les DRO induits par le PAO.

Une découverte majeure de cette étude est l'observation d'un niveau plus élevé de DRO dans les cellules dont l'expression de la PIMT a été inhibée par siRNA puis traitées avec le PAO. Ces résultats indiquent pour la première fois que la PIMT contribue à la défense antioxydante de la cellule, ce qui est en accord avec la stimulation rapide de la synthèse de la PIMT par les DRO induits par le PAO. Rappelons que l'accumulation des DRO est un facteur contribuant au vieillissement cellulaire, aux désordres physiologiques tels que l'hypertension et aux maladies neurodégénératives (Valko *et al.* 2007). Étant donné que la PIMT répare les protéines endommagées par la méthylation de leurs résidus aspartates altérés (L-isoaspartates, D-aspartates), nous postulons que l'induction de la PIMT par les DRO servirait à prévenir la désamidation/isomérisation des protéines antioxydantes.

Nous avons par la suite émis l'hypothèse que l'expression de la PIMT est modulée aux mitochondries car elles sont les principales sources de DRO intracellulaires (Boveris, 1984). En support à cela, des études ont montré que la PIMT était présente et active dans les mitochondries (Taylor *et al.* 2003; Kharbanda *et al.* 2007). Comme attendu, les analyses par immunobuvardage de type Western ont révélé que le CCCP, un agent découplant de la chaîne de transport d'électrons, a induit l'expression de la PIMT dans les fractions mitochondriales des cellules de neuroblastomes SH-SY5Y.

L'analyse par électrophorèse 2D a démontré que les lysats cellulaires exprimaient une isoforme de la PIMT migrant à 27 kDa et un pI de 4.4 alors que la fraction mitochondriale contient deux isoformes de la PIMT migrant aussi à 27 kDa mais ayant des pI de 4.7 et 4.9. Chacune des fractions cellulaires ont en commun une protéine immunoréactive migrant à 57 kDa avec un pI de 5.8 ce qui suggère un dimère de PIMT. Ceci a été validé par la suite en mesurant son activité enzymatique. Ainsi, on a retrouvé deux isoformes spécifiques de la PIMT dans les fractions mitochondriales ce qui suggère que la PIMT mitochondriale serait régulée de façon différente. Cependant, il reste à élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans la relocalisation de la PIMT aux mitochondries. Par exemple, la présence de la PIMT dans les mitochondries pourrait dépendre d'une modification post-traductionnelle. D'un autre côté, la structure de la PIMT pourrait contenir un motif qui lui permet d'interagir avec certaines protéines des mitochondries. En accord avec ces deux possibilités, nous avons trouvé que la transfection stable des cellules SH-SY5Y avec le plasmide pCMV6-PIMT-FLAG conduit à un fort niveau d'expression de la PIMT couplée avec un FLAG en C-terminal dans les lysats cellulaires mais non dans les fractions mitochondriales (annexe I : fig. 1.4). Ces données indiquent que la région C-terminale de la PIMT contient des caractéristiques contribuant à sa localisation mitochondriale.

Lorsque les protéines des fractions mitochondriales ont été séparées par électrophorèse en conditions non réductrices, nous avons trouvé des formes monomériques et multimériques de PIMT dans ces fractions. En accord avec l'analyse par électrophorèse 2-D, la présence d'une troisième forme de PIMT à 57 kDa a aussi été observée, renforçant la possibilité que la PIMT puisse former des dimères. Suite aux traitements avec le CCCP, on a montré que l'expression des monomères de PIMT diminue tandis que celle des multimères de PIMT augmente dans les fractions mitochondriales. Une diminution du niveau d'expression des monomères de PIMT a aussi été observée dans les fractions solubles des cellules traitées au CCCP. Par contre, dans ces fractions, les multimères de PIMT n'ont pas été observés et la protéine à 57 kDa est exprimée à un très faible niveau, suggérant que ces formes sont plutôt associées à la fraction mitochondriale. De manière importante, les multimères de PIMT se désassemblent en monomères de PIMT en conditions d'électrophorèse réductrices. Lors d'une perturbation mitochondriale avec le CCCP, ce processus est corrélé avec une augmentation marquée des

monomères de PIMT. Ces résultats révèlent que la PIMT est prédisposée à la modification oxydative dans les fractions mitochondriales. Les groupements sulfhydryles des résidus cystéines sont particulièrement enclins à ce type d'oxydation (Chiappetta *et al.* 2010). Toutefois, une protéine immunoréactive à 97 kDa a été détectée dans les gels de séparation en conditions d'électrophorèse réductrices, suggérant que d'autres modifications contribuent à la formation des multimères de PIMT.

La formation des multimères de PIMT par le CCCP dans les fractions mitochondriales a été bloquée avec l'acide ascorbique, ce qui a démontré l'implication des DRO. L'acide ascorbique a aussi prévenu la diminution des monomères déclenchée par la CCCP dans les fractions solubles et mitochondriales. Alternativement, cet effet peut être aussi attribué en partie à une stimulation de l'expression des monomères de PIMT des fractions solubles et mitochondriales par l'acide ascorbique. Dans l'ensemble, ces données suggèrent que les DRO induits par le CCCP contribuent à l'assemblage des multimères de PIMT dans les mitochondries par la formation de ponts disulfures entre les monomères de PIMT dérivés des fractions solubles et mitochondriales. On peut aussi concevoir que les DRO mitochondriaux agissent comme un signal pour la translocation des monomères de PIMT des fractions solubles vers les mitochondries. Or, il est connu que les DRO mitochondriaux peuvent moduler l'expression des protéines du cytosol (Murphy, 2009). Par exemple il a été rapporté que les DRO mitochondriaux modulent l'expression de la hème oxygénase dans les cellules endothéliales soumises à un stress de cisaillement (Han *et al.* 2009).

D'un autre côté, nous avons aussi découvert que le CCCP cause l'augmentation du niveau des résidus aspartates anormaux (L-isoaspartates et/ou D-aspartates) sur les protéines mitochondriales avec un poids moléculaire élevé et qui restent séquestrées dans les gels d'entassement. Ces résultats sont en accord avec une étude précédente qui a rapporté que le stress oxydatif induit la formation de résidus L-isoaspartates sur les protéines membranaires (Ingrosso *et al.* 2000). Nos données suggèrent que les protéines endommagées par cette modification seraient plus sujettes à dénaturer et à agréger, probablement de concert avec des protéines oxydées, résultant en agrégats protéiques qui restent piégés dans les gels d'entassement durant l'analyse par électrophorèse. Dans ce contexte, l'accumulation de ces

protéines de haut poids moléculaire pourrait altérer les fonctions mitochondriales. Des expériences en vue d'identifier par spectrométrie de masse puis d'étudier ces protéines particulières pourraient fournir des nouvelles données sur les dysfonctions mitochondriales et aider à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'immunodétection des monomères, des dimères et multimères de PIMT dans les fractions mitochondriales a été validée par la découverte majeure qu'elles sont enzymatiquement actives. Suite à la perturbation mitochondriale induite par le CCCP, l'activité des monomères de PIMT a diminué tandis que celle des multimères de PIMT a augmenté, ce qui reflète les changements observés au niveau de l'expression protéique. De plus, l'activité la plus élevée a été mesurée pour les dimères de PIMT, ce qui est en accord avec le fait qu'ils sont les formes de PIMT les plus abondantes dans les mitochondries. À notre connaissance, cette étude est la première à montrer que la PIMT est exprimée et active non seulement en tant que monomères, mais aussi en tant que dimères et multimères dans les fractions mitochondriales.

Étant donné que la formation de ponts disulfures participe à la multimérisation de la PIMT, nous avons spéculé que cette modification covalente devrait affecter l'activité de la PIMT. En effet, quand les multimères de PIMT ont été exposés à l'agent réducteur DTT, leur activité a fortement augmenté, démontrant que les monomères de PIMT sont enzymatiquement plus actifs que la forme multimérique. Les multimères de PIMT provenant de cellules traitées avec le CCCP ont été considérablement plus actifs par rapport aux cellules témoins. Suivant la réduction avec le DTT, nous avons étonnamment trouvé que l'activité de la PIMT était pratiquement abolie. Ces résultats suggèrent que la perturbation mitochondriale avec le CCCP induit l'oxydation et l'inactivation des monomères de PIMT. En accord avec la prévention de la formation des multimères de PIMT par l'acide ascorbique, nous proposons que les DRO inactivent fortement les monomères de PIMT mais simultanément contribuent à la formation de liens disulfures entre les monomères conduisant à l'organisation de multimères actifs.

L'acide ascorbique seul n'a pas diminué la quantité des multimères de PIMT, suggérant que la diminution du niveau endogène des DRO mitochondriaux reconnus par l'acide ascorbique n'est pas suffisante pour prévenir l'assemblage des multimères de PIMT. Ainsi, d'autres mécanismes ou d'autres types de DRO réguleraient la multimérisation de la PIMT en condition basale, soit en absence de CCCP. D'autre part, on peut considérer la possibilité que le temps d'incubation total avec l'acide ascorbique était trop court (7 h) pour affecter le niveau basal des DRO mitochondriaux. Un temps d'incubation variant de 24 à 96 h avec l'acide ascorbique serait plus approprié pour évaluer l'impact des DRO endogènes sur le niveau d'expression basal des multimères de PIMT.

Maintenant, les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des ponts disulfures qui sont nécessaires à l'organisation des multimères de PIMT sont inconnus. Dans le cas du facteur de Von Willebrand, un mécanisme d'oxydoréductase a été décrit pour sa dimérisation et son assemblage en multimères (Purvis *et al.* 2007). Dans cette optique, l'activité des oxydoréductases pourrait contribuer à l'assemblage des multimères de PIMT en condition basale. Des expériences faisant intervenir des inhibiteurs ou des siRNA contre cette classe d'enzymes permettront d'évaluer préliminairement cette hypothèse.

En résumé (fig. 4.1), notre étude suggère que le PAO active la NADH oxydase en réagissant avec les groupements thiols de ces cystéines vicinales, résultant en la formation de DRO qui vont à leur tour induire fortement l'expression des monomères de PIMT dans la fraction soluble. Le NEM, un agent qui modifie spécifiquement les groupements thiols, bloquent de façon significative la stimulation de l'expression de la PIMT par le PAO. Le DPI, qui est un inhibiteur des flavoprotéines telles que la NADH oxydase, prévient significativement l'induction de la PIMT par le PAO. La stimulation de l'expression de la PIMT est complètement et significativement bloquée par le NAC, un antioxydant qui peut directement réagir avec les DRO. L'ensemble de ces résultats démontrent que ce sont les DRO induits par le PAO qui stimulent l'expression de la PIMT. En présence d'un inhibiteur de la synthèse des protéines, la cycloheximide (CHX), l'augmentation de l'expression de la PIMT est inhibée de façon significative, indiquant que les DRO stimulent l'expression de la

PIMT. Enfin, l'inhibition de l'expression de la PIMT par siRNA accroît la formation des DRO induits par le PAO.

En second lieu (fig. 4.1), nos résultats démontrent que le DTT, en réduisant les ponts disulfures au niveau des multimères actifs de la PIMT associée aux fractions mitochondriales, libère des monomères fortement actifs de PIMT en condition basale. Les DRO induit par le CCCP abaissent fortement l'activité des monomères de PIMT mitochondriale. Subséquemment, ces monomères s'assemblent par la formation de ponts disulfures en multimères de PIMT fortement actifs. En parallèle, le CCCP cause une diminution du niveau des monomères de PIMT dans la fraction soluble. Quant à l'acide ascorbique, il bloque la formation des multimères de PIMT et la diminution des monomères de PIMT induites par le CCCP dans les fractions mitochondriales, démontrant de manière convaincante que ces processus sont dépendants des DRO.

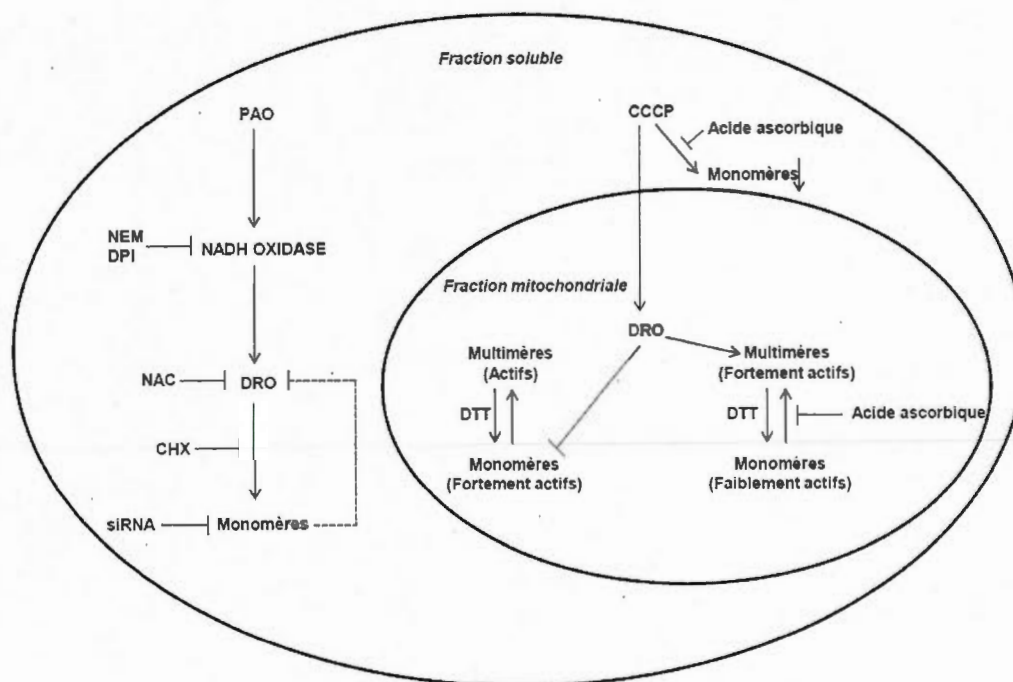


Figure 4.1 Schéma proposant les mécanismes par lesquels les DRO régulent l'expression des monomères et multimères de PIMT.

CHAPITRE V

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La PIMT est une protéine de réparation des résidus L-isoaspartates anormaux majoritairement trouvée dans le tissu cérébral. Les résultats présentés dans cette thèse démontrent pour la première fois que la PIMT est régulée par les DRO. La synthèse de la PIMT est rapidement et fortement stimulée par les DRO induits par le dérivé de l'arsenic PAO, dans les cellules d'astrocytomes U87. Notre modèle expérimental suggère que l'activité NADH oxydase serait activée par le PAO. Il s'ensuit un stress oxydatif qui résulte en l'augmentation de l'expression de la PIMT. La régulation de la PIMT par les DRO serait un mécanisme de réponse face à un stress cellulaire faisant intervenir les voies de signalisation de la NADH/NADPH oxydase. Or, celle-ci est impliquée dans la défense immunitaire, l'apoptose et l'inflammation. Notamment, la NADH/NADPH oxydase est une cible majeure dans le traitement de l'hypertension (Fukui *et al.* 1997). Il serait alors intéressant d'examiner la régulation de la PIMT par la NADH oxydase dans des modèles de rats hypertendus. Comme l'hypertension vasculaire peut avoir un impact négatif sur le cerveau, les cellules cérébrales de ces rats pourraient être isolées en vue d'analyser le niveau d'expression et d'activité de la PIMT.

Nous avons aussi pour la première fois révélé l'importance de la stimulation de la synthèse de la PIMT par les DRO en démontrant que l'inhibition de l'expression de la PIMT favorise fortement la formation des DRO induits par PAO. Ces résultats supportent une nouvelle propriété antioxydante pour la PIMT. La déficience en PIMT chez les souris a été associée à la mort due à des convulsions épileptiques (Yamamoto *et al.* 1998). À l'inverse, une surexpression de la PIMT protégerait contre l'apoptose (Huebscher *et al.* 1999). L'ensemble de ces observations, incluant les nôtres, sont en accord avec un rôle protecteur de

la PIMT pour les fonctions cellulaires. En ce qui concerne la régulation des DRO par la PIMT, l'hypothèse la plus probable est que l'activité de réparation de la PIMT est essentielle pour maintenir l'intégrité fonctionnelle des enzymes impliquées dans les défenses antioxydantes. Pour valider cette idée, on pourrait faire une analyse protéomique afin d'identifier les protéines qui forment des résidus aspartates anormaux lorsque les cellules U87 sont exposées au PAO pour générer des DRO en présence ou absence d'un siRNA contre la PIMT. Toutefois, il est possible que la déficience en PIMT dans notre modèle expérimental ne conduise pas nécessairement à une accumulation des résidus aspartates anormaux sur certaines protéines. Par exemple, l'inhibition de l'expression de la PIMT pourrait affecter le niveau d'expression ou de phosphorylation de diverses protéines. Or, ces changements pourraient aussi être associés à une augmentation des DRO de la cellule.

Alternativement, les NADH/NADPH oxydases sont des enzymes membranaires pouvant être des substrats potentiels de la PIMT. De manière intéressante, il a été démontré que la PIMT peut être liée aux membranes (Boivin *et al.* 1995). De plus, la formation des résidus L-isoaspartates sur les protéines membranaires a été démontrée lors d'un stress oxydatif (Ingrosso *et al.* 2000). En se basant sur ces observations, on pourrait établir des expériences visant à caractériser l'interaction possible entre la PIMT et la NADH/NADPH oxydase au niveau des membranes et à établir si les protéines associées avec la NADH/NADPH oxydase sont isomérisées, par exemple p22^{phox} et Rac 1

Cette thèse met en évidence pour la première fois que la PIMT est aussi exprimée en tant que multimères actifs dans les fractions mitochondriales des cellules de neuroblastomes SH-SY5Y. De plus, nous avons montré que les multimères de PIMT sont essentiellement le résultat de la formation de ponts disulfures entre monomères de PIMT. À court terme, il faudrait que cette forme de PIMT associée aux mitochondries soit aussi identifiée par spectrométrie de masse. Cette technique révélerait quelle cystéine forme des ponts disulfures. Toutefois, cela demande qu'on puisse purifier et enrichir les multimères de PIMT mitochondriale, ce qui serait particulièrement ardu étant donné son faible niveau d'expression. En fait, il faudrait établir une lignée cellulaire qui surexprime la PIMT favorisant ainsi la formation des multimères de PIMT. Pour cela, on pourrait transfecter

stablement les cellules avec un plasmide exprimant la PIMT dont la séquence a été fusionnée avec le signal de localisation mitochondrial du cytochrome c-1, par exemple (Cozzolino *et al.* 2009). Ce plasmide servirait aussi pour générer des mutants des cystéines de la PIMT, ce qui confirmerait que les résidus cystéines sont essentiels pour la multimérisation de la PIMT par le CCCP. De plus, ces expériences de transfections avec la PIMT permettront de vérifier le rôle de la multimérisation de la PIMT dans l'activité mitochondriale et la survie cellulaire.

Dans un autre ordre d'idée, on pourrait évaluer *in vitro* l'interaction entre une PIMT recombinante et les mitochondries. Pour ce faire, on isolerait d'abord les mitochondries de manière à ce qu'elles conservent leur viabilité et leurs fonctions. Ces mitochondries seraient ensuite mises en présence de la PIMT recombinante et traitées avec le CCCP ou l'éthanol (témoin). On procéderait alors au fractionnement des mitochondries en différents compartiments mitochondriaux (membrane externe, membrane interne, espace intermembranaire, matrice) pour déterminer le site d'association ou de localisation préférentielle de la PIMT avec les mitochondries. Parallèlement, ces expériences devraient être effectuées en présence et en absence d'inhibiteurs de l'ouverture des pores mitochondriaux (cyclosporine) et d'antioxydants comme l'acide ascorbique.

Parallèlement, il faut considérer la possibilité que la PIMT interagisse avec les mitochondries par l'intermédiaire d'une autre protéine ou d'un complexe protéique. Par exemple, en condition de stress oxydatif, la translocation de la protéine DJ-1 dans les mitochondries se fait en association avec des protéines chaperons comme la forme cytosolique et mitochondriale de la Hsp70 (Li *et al.* 2005). Dans le cas de la PIMT, la piste des protéines chaperons pourrait être envisagée. Étant donné que la PIMT et la protéine DJ-1 partagent des propriétés communes, on pourrait investiguer le rôle des Hsp70 dans la relocalisation de la PIMT dans les mitochondries. Au niveau expérimental, on pourrait commencer par examiner si l'inhibition de Hsp70 par siRNA défavorise la formation des multimères de PIMT par le CCCP.

En condition basale, les monomères sont plus actifs que les multimères. Étonnamment, nous avons trouvé que le CCCP conduit à la perte d'activité des monomères de PIMT

mitochondriale. Par contre l'activité méthyltransférase est fortement stimulée une fois que les monomères réarrangés en multimères de PIMT. À notre connaissance, ce processus de régulation enzymatique est rarement décrit dans la littérature scientifique. Ceci semble être un nouveau mécanisme de régulation qui protège la PIMT des attaques oxydatives dans les mitochondries. D'autre part, ce mécanisme pourrait prévenir l'accumulation des résidus aspartates endommagés et ainsi contribuer à maintenir les fonctions mitochondriales. C'est pourquoi il serait important de déterminer par spectrométrie de masse la modification qui inactive la PIMT monomérique. De plus, il serait important d'élucider comment la multimérisation de la PIMT la rend plus active lors d'une perturbation mitochondriale avec le CCCP. Étant donné la difficulté que pose l'analyse expérimentale des multimères, une approche bioinformatique permettant de prédire l'assemblage des multimères de la PIMT pourrait fournir des données pertinentes (Comeau et Camacho, 2005). Comme on l'a déjà vu, la dysfonction mitochondriale et le stress oxydatif sont impliqués dans plusieurs maladies neurodégénératives. Or, la compréhension des fonctions des multimères PIMT dans les mitochondries pourrait avoir des impacts thérapeutiques notables.

Basé sur l'ensemble des découvertes de cette thèse, nous postulons que les DRO sont des régulateurs majeurs de la fonction de la PIMT en modulant son niveau d'expression, sa localisation subcellulaire et son organisation structurale. L'ensemble de nos travaux a abouti à un article scientifique et à la publication éventuelle d'un deuxième article scientifique (annexe II). En définitive, la publication de nos travaux de recherche amènera une nouvelle conception de l'enzyme de réparation PIMT.

ANNEXE I

FIGURES SUPPLÉMENTAIRES

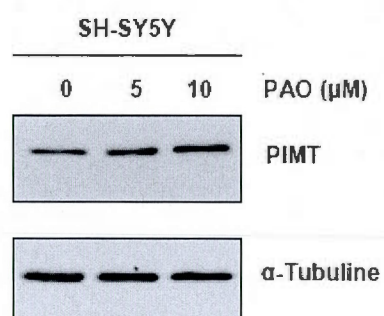


Figure 1.1 Augmentation de l'expression de la PIMT par le PAO dans les cellules de neuroblastomes SH-SY5Y.

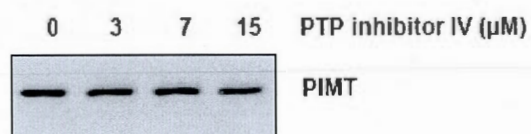


Figure 1.2 Effet d'un inhibiteur spécifique des protéines tyrosines phosphatases (*PTP inhibitor IV*) sur l'expression de la PIMT.

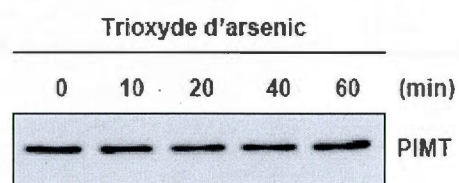


Figure 1.3 Effet du trioxyde d'arsenic sur l'expression de la PIMT.

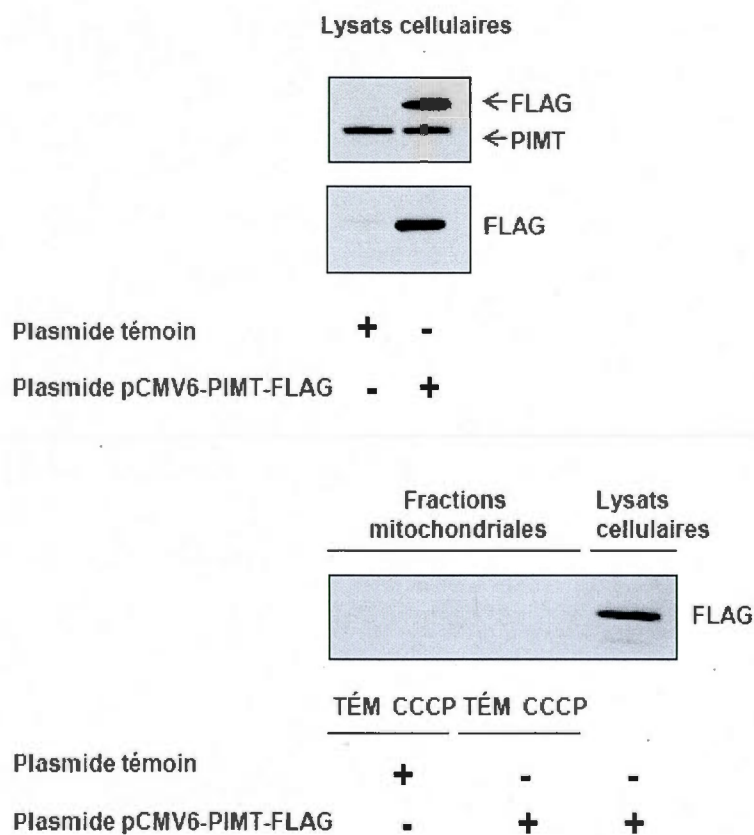


Figure 1.4 Transfection stable du plasmide pCMV6-PIMT-FLAG et détermination du niveau d'expression de la PIMT et de PIMT-FLAG dans les lysats cellulaires et les fractions mitochondriales des cellules SH-SY5Y. Les cellules transfectées ont été traitées avec l'antibiotique G418 afin de sélectionner celles qui ont acquis les plasmides. Par la suite, ces cellules ont été mises en culture dans un milieu DMEM/F12 dans lequel on a ajouté le G418. Les protéines des lysats cellulaires ont été analysées par immunobuvardage de type Western et immunodétectées avec des anticorps anti-PIMT et anti-FLAG. Alternativement, ces cellules ont été traitées avec le CCCP ou l'éthanol (TÉM) et les protéines des fractions mitochondriales ont été immunodétectées avec l'anticorps anti-FLAG. Dans cette condition, on a utilisé les lysats cellulaires comme contrôle positif.

ANNEXE II

CONTRIBUTIONS PERSONNELLES



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Reactive oxygen species generated by thiol-modifying phenylarsine oxide stimulate the expression of protein L-isoaspartyl methyltransferase

Irvens Fanéus, Richard R. Desrosiers*

Université du Québec à Montréal, Département de chimie, C.P. 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Que., Canada H3C 3P8

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 March 2008

Available online 11 April 2008

Keywords:

Protein L-isoaspartyl methyltransferase

Phenylarsine oxide

Protein oxidation

Reactive oxygen species

Astrogloma

ABSTRACT

Expression of the repair enzyme protein L-isoaspartyl methyltransferase (PIMT) has been reported to play important roles in brain. However, little is known about the regulation of PIMT expression following protein damage by oxidation in brain. Phenylarsine oxide (PAO) is an arsenical compound that alters proteins by forming disulfide bond with vicinal cysteinyl residues. Here we report that PIMT was rapidly up-regulated by PAO in U-87 human astrogloma cells. We also confirmed that PIMT up-regulation by PAO was mediated by the reaction with vicinal cysteines. Furthermore, we showed that PIMT induction by PAO was dependent on formation of reactive oxygen species (ROS). Crucially, both ROS formation and PIMT induction by PAO were inhibited by antioxidant *N*-acetyl-L-cysteine and NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium chloride. Importantly, down-regulation of PIMT by siRNA strikingly enhanced PAO-induced ROS. Together, these results highlight that PIMT expression is regulated by ROS and could primarily act as an antioxidant enzyme.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

The protein L-isoaspartyl methyltransferase (PIMT) functions as a repair enzyme by limiting the accumulation of altered aspartyl (L-isoaspartyl) residues in proteins [1]. The formation of L-isoaspartyl residues is a spontaneous process that is related to aging and may lead to loss of protein function [2]. In mammals PIMT has been well characterized in brain, specifically in neurons, where it is highly expressed, and in glial cells where the expression is lower [3].

Altered PIMT expression has been associated with several neurological disorders. For instance, we have demonstrated that PIMT expression was reduced by half in human epileptic hippocampus while remaining unchanged in neocortex [4]. Similarly, we reported that PIMT expression was significantly reduced in human astrocytic tumors [5]. These studies and others [6,7] strongly suggest that PIMT plays a crucial role in the brain. In addition, the brain has been shown to be vulnerable to damage wrought by oxidative stress. Patients with Alzheimer's disease, for instance, show a high degree of oxidative damage in the brain, which is related to the accumulation of β -amyloid plaques and deposition of neurofibrillary tangles [8]. Since PIMT was shown to be up-regulated in neurodegenerative neurons and to localize within neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease [7], this suggests that PIMT expression is likely modulated by oxidative damage in brain.

Reactive oxygen species (ROS) can cause several forms of damage including protein oxidation. This modification occurs on all amino acid side chains but primarily affects the thiol group of cysteine and the sulphhydryl group of methionine [8]. The arsenical derivative phenylarsine oxide (PAO) is widely employed when studying these modifications because of its propensity to specifically react with protein bearing proximal thiol groups on vicinal cysteines [9]. The mechanism of action for PAO involves the cross-link of vicinal cysteines to form a stable intramolecular disulfide bond [10]. We reasoned that, as this effect of PAO was similar to protein oxidation by ROS, it should affect the expression of proteins regulated by protein oxidation conditions. We based our assumption on the fact that PAO has been reported to induce the oxidative stress-related protein heme oxygenase-1 [11,12]. Consequently, the purpose of this study was to use PAO to determine the effects of oxidation-induced protein damage on PIMT expression.

First, we showed that PAO up-regulated PIMT synthesis in the U-87 human astrogloma cell line. Crucially, we observed that PIMT induction correlated with the formation of cellular ROS by PAO. Importantly, both PIMT induction and ROS formation were inhibited by co-treatment with the antioxidant *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) and the NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium chloride (DPI). Strikingly, siRNA-mediated inhibition of PIMT expression led to a higher level of ROS formation in the presence of PAO. These results clearly demonstrate that PIMT expression is regulated by ROS. More importantly, our findings show that PIMT blocks the formation of ROS induced by PAO, suggesting an antioxidant function for this enzyme.

* Corresponding author. Fax: +1 514 987 0246.

E-mail address: desrosiers.r@uqam.ca (R.R. Desrosiers).

Materials and methods

Antibodies. The antibody raised against PIMT (produced and purified at Biotechnology Research Institute, Montreal, QC, Canada) was diluted in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBS-T). Antibodies against thioredoxin reductase-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and α -tubulin (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) were diluted in TBS-T containing 3% bovine serum albumin.

Cell culture, treatments, and lysis. U-87 astrogloma cells were maintained in modified Eagle's medium (MEM) supplemented with 10% fetal calf serum (MEMs) and 10 mM pyruvate. Cells were cultured in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C. Cells (2×10^5) were plated into each well of 6-well plates, grown for 48 h and then treated with PAO, DPI (Calbiochem, La Jolla, CA), cycloheximide, N-ethylmaleimide (NEM), dithiothreitol (DTT), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DCNB), NAC or tert-Butyl hydroperoxide (TBHP) (Sigma, Oakville, ON). At the end of the treatments, cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and scraped in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris pH 7.40, 1% CHAPS, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA) which contained a protease inhibitor cocktail (Calbiochem, La Jolla, CA) and phosphatase inhibitors (sodium fluoride and sodium orthovanadate at 1 mM each). Cell lysates were kept on ice for 20 min, centrifuged at 10,000g for 10 min at 4 °C and the post-nuclear supernatants were stored at -40 °C. Protein contents were determined with the micro-bicinchoninic acid (BCA) method (Pierce, Rockford, IL). In all experiments, dimethyl sulfoxide (DMSO) was kept at a final concentration of 0.1% (v/v).

siRNA transfections. Transient transfections of thioredoxin reductase-1 siRNA, PIMT siRNA, AllStars negative control siRNA (Qiagen, Valencia, CA), and control siRNA (fluorescein conjugate)-A (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) was performed by the lipofection method using Lipofectamine reagent (Invitrogen, Burlington, ON).

ROS measurement. Cells were grown for 48 h then stained with the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA) probe (Molecular Probes, Eugene, OR) for 30 min. DCHF-DA enters cells where it is hydrolyzed by an esterase to nonfluorescent DCHF. Upon ROS formation, DCHF is oxidized to the highly fluorescent DCF. The cells were washed with MEMs and then incubated with MEMs containing either DMSO (as a control), 5 μ M PAO, or 100 μ M TBHP for 20 min. In some experiments, cells were incubated with 5 mM NAC for 60 min and DCHF-DA was added during the last 30 min. In other experiments, cells were stained with DCHF-DA for 30 min and 8 μ M DPI was added during the last 20 min. Alternatively, cells were washed with MEMs and incubated for 20 min in MEMs containing NAC, DPI, both PAO and NAC, or both PAO and DPI. Following these treatments, cells were harvested and immediately underwent flow cytometric analysis. Data was collected on a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) and analyzed with WinMDI 2.8 software. Propidium iodide was added before flow cytometry to evaluate cell viability. DCF and propidium iodide fluorescence were collected in FL1 and FL2, respectively.

SDS-PAGE and Western blot analysis. Identical amounts of proteins were separated on 12.5% SDS-PAGE gels, transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes; proteins were then immunodetected as previously described [5].

Statistical data analysis. Densitometric analyses of immunodetected proteins were performed with TotalLab TL100 v2006 software (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK). Data are representative of three independent experiments. Statistical significance was assessed using Student's unpaired t-test.

Results and discussion

PIMT expression is up-regulated by PAO

Thiol groups in proteins are prone to various forms of modifications [8]. PAO is a trivalent arsenical compound that specifically cross-links closely spaced thiol groups (vicinal cysteines) [10], promoting thiol oxidation. In order to investigate the relation between PIMT expression and protein oxidation, U-87 human astrogloma cells were used as a model. Western blot analysis showed that PIMT expression was strongly up-regulated after 20 min treatment with PAO in a concentration-dependent manner (Fig. 1A). The level of PIMT expression reached its maximal value at 5 μ M PAO. Thus, this concentration was used for subsequent experiments. We also obtained similar results with the human SH-5YSY neuroblastoma cell line (data not shown). Such a rapid response has also been reported for the induction of heme oxygenase-1 by PAO [11]. As PAO is also known to inhibit protein tyrosine phosphatases, it might therefore stimulate PIMT through inhibition of these phosphatases. However, treatment of U-87 cells with a specific inhibitor of protein tyrosine phosphatases (PTP inhibitor IV) did not up-regulate PIMT expression (data not shown). To our knowledge, such an intense and rapid induction of PIMT expression by a chemical has never been reported.

To further gain insight on the induction of PIMT by PAO, cells were treated with the arsenical agent following pre-incubation with cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. Fig. 1B shows that cycloheximide significantly inhibited the induction of PIMT

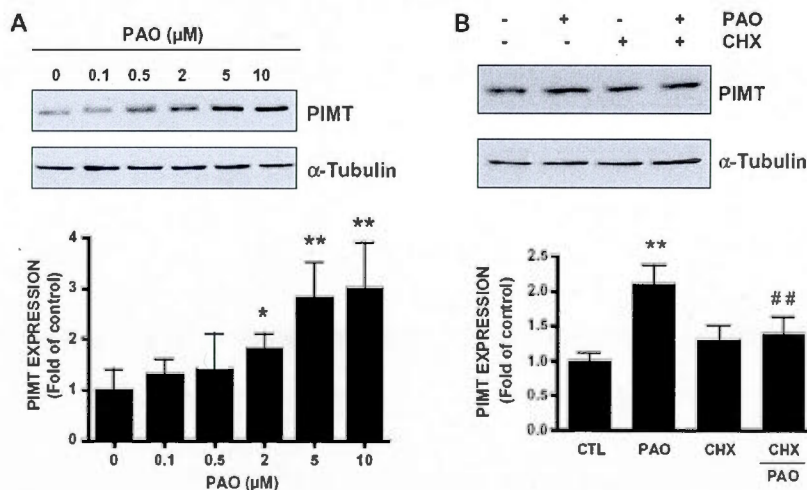


Fig. 1. PAO induces PIMT expression. (A) U-87 cells were treated with indicated concentration of PAO for 20 min or (B) pre-treated with cycloheximide (CHX) at 10 μ M for 30 min prior to adding PAO (5 μ M). Proteins in cell lysates were analyzed by SDS-PAGE followed by Western blotting using specific antibodies. Densitometric analysis of PIMT levels are representative of three independent experiments. Asterisks identify probability values less than 0.05 (*) and 0.01 (**), which were considered significant against the DMSO-treated cells (CTL), while (# #) identifies probability values less than 0.01 which were considered significant against PAO-treated cells.

by PAO, indicating that stimulation of protein synthesis mainly contributed to the increased PIMT level. We reasoned that this rapid synthesis of PIMT was likely caused by protein oxidation at vicinal cysteines by PAO since this compound specifically cross-links vicinal sulphhydryl groups.

PIMT up-regulation is dependent on PAO's ability to react with vicinal cysteines

To investigate the relationship between the stimulation of PIMT expression and protein oxidation at vicinal thiols by PAO, U-87 cells were treated with this arsenical compound in the presence of NEM, a thiol-modifying agent, and DTT, a thiol reducing agent that can also complex with PAO [10]. Both agents have been shown to prevent cross-linking by PAO [13]. As expected, PIMT expression was markedly and significantly up-regulated by PAO (Fig. 2A). Unexpectedly, NEM alone diminished PIMT expression while DTT alone marginally augmented PIMT expression, suggesting a possible role for thiol groups in the regulation of PIMT. Importantly, when cells were treated with NEM prior to PAO, PIMT induction was abolished and cells exhibited a PIMT level similar to that seen with NEM alone. Pretreatment with DTT, on the other hand, also inhibited PIMT induction by PAO. However, the lesser effect of DTT could be attributed to an unstable complex with PAO [14] or to cytotoxicity because it also caused a diminution of the α -tubulin

level. Overall, these results suggested that PIMT up-regulation by PAO was mediated by proteins bearing vicinal cysteines.

The intracellular antioxidant defense is primarily comprised of the thioredoxin reductase/thioredoxin system and the glutathione-related system [8,15]. Enzymes involved in both systems contain vicinal cysteinyl residues that can be targeted by PAO, in particular selenoproteins such as thioredoxin reductase [16]. In fact, previous studies have reported that PAO can inactivate thioredoxin reductase but not the glutathione-related enzymes such as glutaredoxin and glutathione reductase [9,17]. PAO was also shown to marginally decrease cellular glutathione but at concentrations 10–20 times higher than the concentration (5 μ M) used throughout our study [9,18]. Based on these observations, we decided to investigate the involvement of thioredoxin reductase in the up-regulation of PIMT by PAO. Thioredoxin reductase catalyzes the reduction of the disulfide bond in thioredoxin, making the activity of thioredoxin directly dependent on thioredoxin reductase integrity [19]. Therefore, to examine the role of thioredoxin reductase/thioredoxin, we performed treatments with the thioredoxin reductase inhibitor DCNB [20]. Fig. 2B shows that DCNB did not affect PIMT expression. To confirm this result, we transfected U-87 cells with siRNAs against thioredoxin reductase. As shown in Fig. 2C, marked inhibition of thioredoxin reductase expression by four different siRNA did not significantly stimulate PIMT expression. Results with DCNB and siRNA treatments clearly

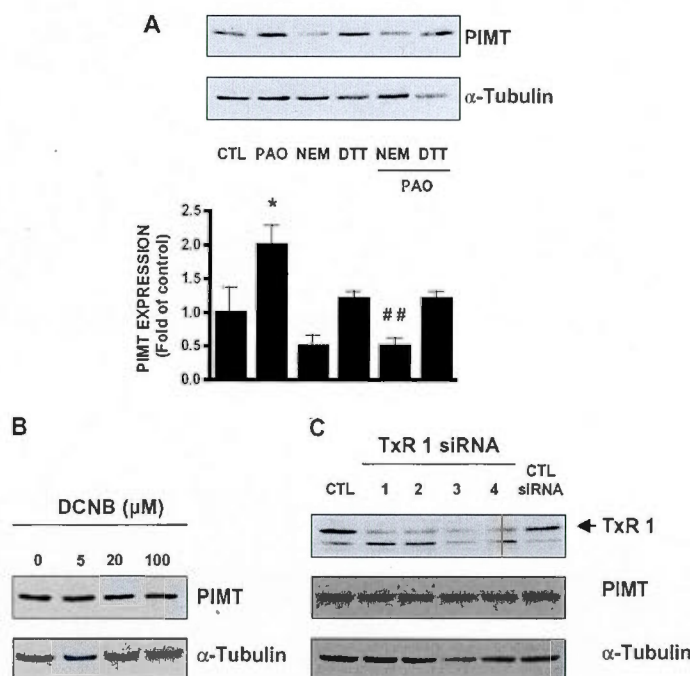


Fig. 2. PIMT is up-regulated by PAO through oxidation of vicinal cysteinyl residues independently of thioredoxin reductase. (A) U-87 cells were kept in DMSO (CTL) or treated with 50 μ M NEM, 0.5 mM DTT and 5 μ M PAO for 20 min. In some cases, NEM and DTT were added 5 min before PAO or DMSO then incubated for an additional 20 min. The expression of PIMT and α -tubulin in cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. Data and densitometric analysis of PIMT levels are representative of three independent experiments. * $P < 0.05$ was considered significant against the DMSO-treated cells, and ## $P < 0.01$ was considered significant against PAO-treated cells. (B) Cells were treated with indicated concentrations of DCNB for 20 min. (C) Cells were transfected with four variants of thioredoxin reductase-1 (TxR 1) siRNA and with a control siRNA (fluorescein conjugate)-A at 20 nM for 48 h. Cell treatments with the control siRNA (fluorescein conjugate)-A showed about 80% transfection efficiency. Lysates were analyzed by Western blotting using antibodies against TxR 1, PIMT, and α -tubulin.

suggested that PIMT up-regulation by PAO was not mediated by thioredoxin reductase/thioredoxin.

PIMT up-regulation is mediated by PAO-induced formation of ROS

Since the up-regulation of PIMT by PAO appeared to be independent of thioredoxin reductase/thioredoxin, enzymes implicated in the antioxidant defenses of the cell, we considered whether PAO could trigger pro-oxidant responses. This can be determined by measuring the production of ROS in cells treated with PAO, although the latter has never been reported to induce ROS formation. Using the DCHF probe, which becomes fluorescent proportionally to ROS formation, we found that PAO significantly induced ROS generation in U-87 cells (Fig. 3A and B). To our knowledge, this is the first evidence showing ROS formation in cells treated with PAO. To validate this effect of PAO, cells were incubated with antioxidants NAC and DPI prior to PAO treatments. The antioxidant NAC acts as a ROS scavenger, but is usually employed to increase intracellular levels of glutathione, one of the major non-enzymatic antioxidants in the cell [8,21]. DPI, on the other hand, is an inhibitor of the inducible electron transport system NADPH oxidase, which results in the inhibition of ROS generation [22,23]. As shown in Fig. 3A and B, NAC alone weakly decreased ROS formation in comparison with the control, supporting its antioxidant property. When added prior to PAO, NAC abrogated the PAO-induced formation of ROS. Unexpectedly, DPI caused a significant induction of ROS. However, this result is in line with a study conducted by Riganti et al. [24]. In spite of this, DPI significantly inhibited the PAO-induced formation of ROS. Under all conditions, cell viability remained constant, indicating that the results observed

were not associated with increased cell death. Together, these findings convincingly demonstrated that PAO was a ROS inducer.

Having demonstrated that PAO effectively induced ROS in U-87 cells, we next examined whether it could up-regulate PIMT expression through this mechanism. Western blot analysis showed that the PIMT level was enhanced by PAO, and more importantly, that PIMT up-regulation was significantly blocked when NAC or DPI was added prior to PAO (Fig. 3C). These results clearly showed that PIMT expression was up-regulated by ROS.

PIMT down-regulation enhances PAO-induced ROS

In order to examine the role of PIMT in the ROS production by PAO in U-87 cells, we inhibited PIMT expression by siRNA and then treated the cells with PAO. Fig. 4A and B show that, as expected, ROS formation was stimulated in cells which were first transfected with a control siRNA and then treated with PAO. Significantly, in cells transfected with the PIMT siRNA, the level of ROS formation by PAO was higher than the level observed in cells transfected with the control siRNA. These results demonstrated that PIMT down-regulation increased ROS formation by PAO. Again, cell viability remained stable under all conditions. Fig. 4C shows that PIMT up-regulation by PAO was abolished in PIMT siRNA-transfected cells, supporting that the enhanced ROS formation was dependent on the inability of the cells to stimulate PIMT synthesis. Together, these findings let us conclude that PIMT possesses an antioxidant activity.

The aim of this study was to investigate the relationship between PIMT expression and protein oxidation. We found that thiol oxidation by PAO up-regulates PIMT expression through ROS for-

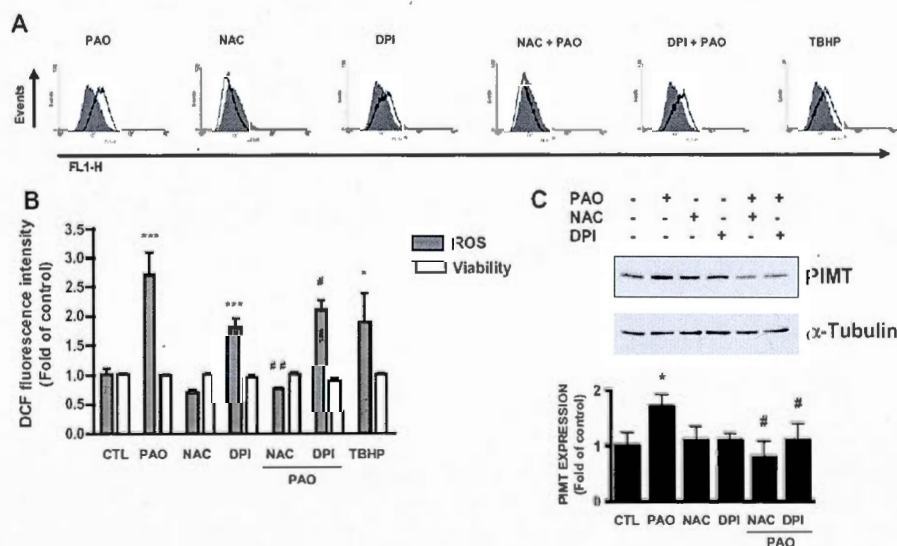


Fig. 3. PIMT up-regulation is dependent on PAO-induced formation of ROS. (A) U-87 cells were stained with DCHF-DA for 30 min and then treated with DMSO (CTL) or PAO (5 μ M), or TBHP (100 μ M) for 20 min. TBHP was used as a positive control for intracellular ROS generation. In some experiments, cells were incubated with NAC (5 mM) for 60 min and DCHF-DA was added during the last 30 min. In other experiments, cells were stained with DCHF-DA for 30 min and DPI (8 μ M) was added for the last 20 min. In certain experiments, PAO was added to cells incubated in the presence of NAC or DPI. Following these treatments, cells were harvested and immediately underwent flow cytometric analysis. Grey peaks represent the DMSO-treated cells while the white peaks correspond to DCF fluorescence generated during the different treatments. (B) Histogram representation of DCF fluorescence intensity measured by flow cytometric analysis. Cell viability was evaluated by propidium iodide staining. (C) Effect of cell treatments with NAC and DPI prior to DMSO (CTL) or PAO addition on PIMT expression. Proteins were submitted to SDS-PAGE, and PIMT and α -tubulin were immunodetected. Data and densitometric analysis of PIMT levels are representative of three independent experiments. * P < 0.05 and ** P < 0.01 were considered significant against the DMSO-treated cells. *** P < 0.001 were considered significant against PAO-treated cells.

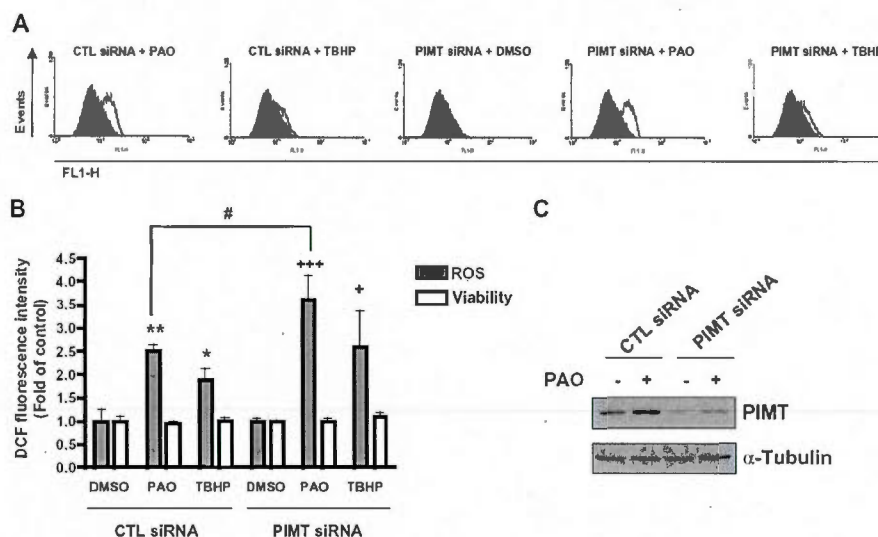


Fig. 4. Down-regulation of PIMT increases the level of ROS formation by PAO. (A) U-87 cells were transfected with a PIMT siRNA or with AllStars negative control siRNA (CTL siRNA) at 40 nM for 48 h. Cells were afterward stained with DCFH-DA for 30 min, washed and subsequently treated with DMSO or PAO (5 μ M), or TBHP (100 μ M) for 20 min. TBHP was used as a positive control for intracellular ROS generation. Flow cytometric analysis was performed immediately after treatments. Grey peaks represent the CTL siRNA and DMSO-treated cells while the white peaks correspond to DCF fluorescence generated during the different treatments. (B) Histogram showing the DCF fluorescence intensity for each treatment. Cell viability was monitored by propidium iodide staining. (C) Western blot analysis is representative of cells transfected with a PIMT siRNA or a CTL siRNA followed or not by PAO treatments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ were considered significant against the CTL siRNA and DMSO-treated cells, *** $P < 0.001$ were considered significant against the PIMT siRNA and DMSO-treated cells while * $P < 0.05$ identifies significant difference between PIMT siRNA-transfected cells and CTL siRNA-transfected cells followed by PAO treatments.

mation. An interesting candidate for explaining the ability of PAO to stimulate PIMT expression could be NADH/NADPH oxidase. This enzyme has been shown to contain vicinal cysteines [25], which agrees with our results (Fig. 2A). While it was reported that PAO inhibits NADPH oxidase, others have reported that the effect of PAO on NADPH oxidase is more complex [25,26]. Indeed, PAO was shown to slightly inhibit NADPH oxidase activity but to significantly increase its NADH oxidase activity [26]. These observations support a model in which PIMT could be up-regulated by PAO through NADH oxidase activation. Thus, inhibitors of NADH-utilizing flavoproteins such as DPI should block this effect as we demonstrate in this study (Fig. 3C). Future investigations will be required to clarify the involvement of NADH oxidase activity in PIMT induction by the protein oxidant PAO. Currently, we cannot rule out the possibility that other mechanisms could also participate in the stimulation of PIMT expression by PAO through ROS generation.

Importantly, we additionally demonstrate that down-regulation of PIMT by siRNA enhanced PAO-induced ROS. This finding leads us to propose that, in response to ROS formation, cells trigger the synthesis of PIMT (Fig. 1B), which acts as an antioxidant protein (Fig. 4B). Since PIMT repairs damaged proteins through methylation of altered aspartyl (L-isoaspartyl) residues, it could be postulated that PIMT induction by ROS could help to maintain under an active state proteins participating in antioxidant defense. Thus, our results reveal a new function for PIMT and suggest its participation in the regulation of apoptotic and inflammatory processes.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada to Dr Richard R. Des-

rosiers. We thank Dr Michel Marion for his technical assistance in flow cytometric analysis.

References

- [1] J. Lanthier, R.R. Desrosiers, Protein L-isoaspartyl methyltransferase repairs abnormal aspartyl residues accumulated in vivo in type-I collagen and restores cell migration, *Exp. Cell Res.* 293 (2004) 96–105.
- [2] S. Clarke, Aging as war between chemical and biochemical processes: protein methylation and the recognition of age-damaged protein for repair, *Ageing Res. Rev.* 2 (2003) 263–285.
- [3] T. Shirasawa, R. Endoh, Y.X. Zeng, K. Sakamoto, H. Mori, Protein L-isoaspartyl methyltransferase: developmentally regulated gene expression and protein localization in the central nervous system of aged rat, *Neurosci. Lett.* 188 (1995) 37–40.
- [4] J. Lanthier, A. Bouthillier, M. Lapointe, M. Demeule, R. Béveillé, R.R. Desrosiers, Down-regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase in human epileptic hippocampus contributes to generation of damaged tubulin, *J. Neurochem.* 83 (2002) 581–591.
- [5] M. Lapointe, J. Lanthier, R. Mounmdjian, A. Régina, R.R. Desrosiers, Expression and activity of L-isoaspartyl methyltransferase decrease in stage progression of human astrocytic tumors, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 135 (2005) 93–103.
- [6] W. Chen, J. Ji, B. Ru, Proteomic analysis of corticobasal degeneration: a case study of corticobasal degeneration at the proteome level, *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 17 (2005) 364–371.
- [7] T. Shimizu, A. Watanabe, M. Ogawara, H. Mori, T. Shirasawa, Isoaspartate formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease, *Arch. Biochem. Biophys.* 381 (2000) 225–234.
- [8] M. Valko, D. Leibfriz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radical and antioxidants in normal physiological function and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 44–84.
- [9] J.E. Biaglow, I.S. Ayens, S.W. Turtle, C.J. Koch, J. Donahue, J.J. Mielal, Role of vicinal protein thiol in radiation and cytotoxic responses, *Radiat. Res.* 165 (2006) 307–317.
- [10] L.A. Stocken, R.H.S. Thompson, British anti-Lewisite. I. Arsenic derivatives of thiol proteins, *Biochem. J.* 40 (1946) 529–535.
- [11] O.S. Gildemeister, J.A. Pepe, R.W. Lambrecht, H.L. Bonkovsky, Induction of heme oxygenase-1 by phenylarsine oxide. Studies in cultured primary liver cells, *Mol. Cell. Biochem.* 226 (2001) 17–26.

- [12] S.W. Ryter, A.M.K. Choi, Heme oxygenase-1: redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models, *Antioxid. Redox Signal.* 7 (2005) 80–91.
- [13] P. Korge, J.I. Goldhaber, J.N. Weiss, Phenylarsine oxide induces mitochondrial permeability transition, hypercontracture, and cardiac cell death, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280 (2001) 2203–2213.
- [14] K. Rokutan, M. Miyoshi, S. Teshima, T. Kawai, T. Kawahara, K. Kishi, Phenylarsine oxide inhibits heat shock protein 70 induction in cultured guinea pig gastric mucosal cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279 (2000) 1506–1515.
- [15] J. Nordberg, E.S.J. Arn  r, Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system, *Free Radic. Biol. Med.* 31 (2001) 1287–1312.
- [16] O. Rengby, L. Johansson, L.A. Carlson, E. Serini, A. Vlamis-Gardikas, P. Karsn  s, E.S.J. Arn  r, Assessment of production conditions for efficient use of *Escherichia coli* in high-yield heterologous recombinant selenoprotein synthesis, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 5159–5167.
- [17] M. Pallis, T.D. Bradshaw, A.D. Westwell, M. Grundy, M.F.G. Stevens, N. Russell, Induction of apoptosis without redox catastrophe by thioredoxin-inhibitory compounds, *Biochem. Pharmacol.* 66 (2003) 1695–1705.
- [18] S. Mendiratta, Z.-C. Qu, J.M. May, Enzyme-dependent ascorbate recycling in human erythrocytes: role of thioredoxin reductase, *Free Radic. Biol. Med.* 25 (1998) 221–228.
- [19] J.E. Biaglow, R.A. Miller, The thioredoxin reductase/thioredoxin system: novel redox targets for cancer therapy, *Cancer Biol. Ther.* 4 (2005) 6–13.
- [20] E.S.J. Arn  r, M. Bj  rnstedt, A. Holmgren, 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene is an irreversible inhibitor of human thioredoxin reductase, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 3479–3482.
- [21] B. Konarkowska, J.F. Aitken, J. Kistler, S. Zhang, G.J.S. Cooper, Thiol reducing compounds prevent human amylin-evoked cytotoxicity, *FEBS J.* 272 (2006) 4949–4959.
- [22] B.M. Babior, J.D. Lambeth, W. Nauseef, The neutrophil NADPH oxidase, *Arch. Biochem. Biophys.* 397 (2002) 342–344.
- [23] S. Turcotte, R.R. Desrosiers, R. Béliveau, HIF-1(mRNA and protein upregulation involves Rho GTPase expression during hypoxia in renal cell carcinoma, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 2247–2260.
- [24] C. Riganti, E. Gazzano, M. Polimeni, C. Costamagna, A. Bosia, D. Ghigo, Diphenyliodonium inhibits the cell redox metabolism and induces oxidative stress, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 47726–47731.
- [25] V. Le Cabec, L. Maridonneau-Parini, Complete and reversible inhibition of NADPH oxidase in human neutrophils by phenylarsine oxide at a step distal to membrane translocation of the enzyme subunits, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 2067–2073.
- [26] M. Janiszewski, M.A. Pedro, R.C.H. Scheffer, J.T.H. Van Asseldonk, L.C. Souza, P.L. Luz, O. Augusto, F.R.M. Laurindo, Inhibition of vascular NADH/NADPH oxidase activity by thiol reagents: lack of correlation with cellular glutathione redox status, *Free Radic. Biol. Med.* 29 (2000) 889–899.

ANNEXE III

CONTRIBUTION À LA RÉDACTION D'UN ARTICLE DE REVUE

Damaged Proteins Bearing L-Isoaspartyl Residues and Aging: A Dynamic Equilibrium Between Generation of Isomerized Forms and Repair by PIMT

Richard R. Desrosiers* and Irvens Fanéllus

Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8

Abstract: Proteins are susceptible to numerous non-enzymatic post-translational modifications which occur both during normal aging and in neurodegenerative states. For instance, formation of abnormal L-isoaspartyl residues arising from both the deamidation of L-asparaginyl residues and the isomerization of L-aspartyl residues is a frequent chemical modification that affects proteins. The formation of L-isoaspartyl residues in proteins alters their three-dimensional structure leading usually to a loss of function. Notably, accumulation of isomerized proteins could contribute to metabolic dysfunctions in neuronal cells during aging reducing cognitive functions in elderly patients and would eventually promote the development of neurodegenerative diseases. The protein L-isoaspartyl (D-aspartyl) methyltransferase (PIMT) is an enzyme that recognizes and repairs the abnormal L-isoaspartyl residues in proteins. Its expression appears to decline during aging which could partially explain the build up of damaged proteins in old age. In this review, we summarize recent findings, based mostly on proteomic data, regarding the formation and accumulation of proteins bearing atypical L-isoaspartyl residues as well as PIMT functions during normal aging and in some neurodegenerative diseases. The emphasis is on possible molecular mechanisms controlling PIMT expression and the ability of PIMT to repair isomerized substrates during aging. Investigation of processes regulating age-related accumulation of isomerized proteins is a promising avenue to a better understanding of aging at the protein level.

Keywords: Aging, Damaged proteins, L-isoaspartyl residues, PIMT.

INTRODUCTION

Aging is a biological process characterized by progressive deterioration of cellular and tissue functions due to the accumulation of macromolecular damage arising from processes such as decline in DNA repair, lipid peroxidation and non-enzymatic modifications of proteins. A great variety of molecular mechanisms, including oxidation and glycation of proteins as well as formation of altered aspartyl residues, are known to promote the build up of damaged proteins in cells [review in 1] and in the extracellular matrix during aging [2]. Deamidation of L-asparaginyl residues and isomerization and racemization of L-aspartyl residues are well documented mechanisms involved in the generation of atypical L-isoaspartyl and D-aspartyl residues in peptides and proteins [review in 3-4]. L-isoaspartyl residues are the predominant products from these non-enzymatic reactions. These pathways are summarized in Fig. (1).

FUNCTIONAL CONSEQUENCES OF ACCUMULATION OF ATYPICAL ASPARTYL RESIDUES IN PROTEINS

In proteins containing atypical L-isoaspartyl residues, the peptide backbone is transferred from the α -carboxyl group to the side-chain β -carboxyl group (Fig. (1)). As expected, this new peptide backbone affects tertiary protein structure and is usually detrimental to protein function. For instance,

deamidation of α A-crystallin at Asn¹⁰¹ and Asn¹²³ and of α B-crystallin at Asn¹⁴⁶ induced major changes in the structural and functional properties of these proteins [5,6]. Furthermore, when wild-type α A-crystallin was incubated with deamidated α B-crystallin, protein complexes showed diminished chaperone activity and formation of shorter oligomers than did complexes composed of deamidated α A-crystallin and wild-type α B-crystallin [6]. Since, during aging, lenses accumulate extensively deamidated forms of α -, β - and γ -crystallins [review in 7], these multiple sites of deamidation that appear with different kinetics should deeply affect protein structures. This supports the assumption that this non-enzymatic modification contributes to crystallin insolubility during aging. However, further studies will be required to assess the real contribution of crystallin deamidation to lens opacity or to cataracts which are the major cause of blindness worldwide.

In some cases, the formation of L-isoaspartyl residues leads to a gain of functions. This has been well illustrated with both cAMP-dependent protein kinase A (PKA) and fibronectin. PKA is a tetrameric kinase composed of two regulatory subunits and two catalytic subunits. The catalytic subunits (C) of PKA exist in three variants and two of them, C α and C β , are deamidated by about 30% at Asn² *in vivo* [8, 9]. The more acidic N-terminal end of deamidated catalytic subunits of PKA favors a cytoplasmic localization that results in a lower phosphorylation level of transcription factors of CREB family [9].

Fibronectins are adhesive proteins of extracellular matrix that attach cells through their interactions with various integrins. Interestingly, it has been reported that deamidation

*Address correspondence to this author at the Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8; Tel: (514) 987-3000; Ext: 8791; Fax: (514) 987-4054; E-mail: desrosiers.r@uqam.ca

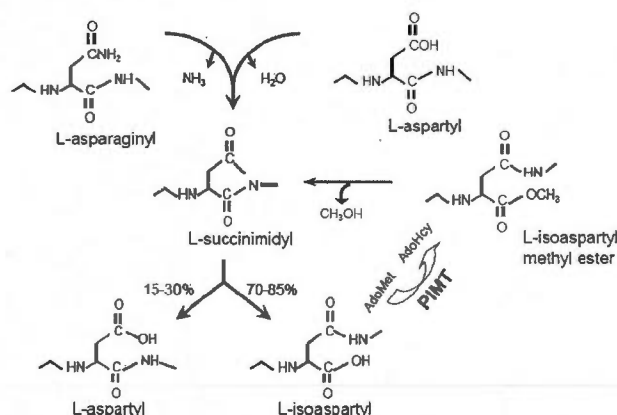


Fig. (1). Chemical modifications that are responsible for formation of damaged L-isoaspartyl residues in proteins and the repair of isomerized aspartyl residues by the methyltransferase PIMT.

Spontaneous deamidation of L-asparaginyl residues and dehydration of L-aspartyl residues in proteins could lead to the generation of unstable succinimide intermediates that hydrolyze to a mixture of L-isoaspartyl and L-aspartyl residues. The L-isoaspartyl residues are then recognized by the enzyme PIMT where S-adenosyl-L-methionine (AdoMet) is the donor for the methyl moieties. The methyltransferase modifies the free α -carbonyl groups of L-isoaspartyl residues and produces S-adenosyl-L-homocysteine (AdoHcy). Under physiological conditions, the methyl ester linkage would spontaneously hydrolyze resulting in the release of methanol and the formation of succinimide intermediates again. Multiple cycles of L-isoaspartyl residues methylation by PIMT will gradually repair isomerized proteins [2]. It has been reported that the repair action of PIMT can restore biological activity of proteins [2].

of Asn²⁶³ at the Asn-Gly-Arg (NGR) sequence in the fibronectin N-terminal region led to an α v β 3-integrin binding site containing the L-isoDGR motif [10]. Fibronectin is a protein that is relatively abundant in serum and tissues and which exhibits low turnover in tissues. Thus, it could be predicted that the spontaneous formation and gradual accumulation of fibronectin with the L-isoDGR motif during aging could be a factor that influences the strength of cell binding to the extracellular matrix and would be expected to affect signalling pathways that are dependent upon the activation of α v β 3-integrins.

Although it is usually considered that deamidation of L-asparaginyl residues and isomerization of L-aspartyl residues resulting in the formation of L-isoaspartyl residues are damaging mechanisms that inactivate functions in aged proteins, in certain circumstances these chemical modifications are mechanisms conferring new properties (PKA) or functions (fibronectin) to proteins. This illustrates that gain of functions in PKA, fibronectin and likely in other deamidated proteins is a new field to investigate for the positive effects of aging on protein functions.

PIMT IS AN ENZYME THAT METHYLATES PROTEINS WITH ABNORMAL ASPARTYL RESIDUES

The protein L-isoaspartyl (D-aspartyl) methyltransferase (PIMT) is an enzyme that catalyzes the transfer of a methyl group from S-adenosyl-L-methionine (AdoMet) to free carboxyl groups of abnormal aspartyl residues to repair them (Fig. (1)) [3, 11]. PIMT is ubiquitously expressed in living

beings from bacteria to humans. Human PIMT [12] is a monomeric enzyme containing 226 amino acids with a molecular weight of 24500 Da (Fig. (2)). The alanine residue at the NH₂-terminus end is acetylated (Fig. (2)). Three domains for AdoMet binding have been identified in human PIMT (Fig. (2)).

In most studies, PIMT is described as an intracellular and soluble protein [3, 11]. However, certain studies (Table 1) have reported that PIMT could be associated with cell organelles. For instance, PIMT activity was detectable in microsomes and in mitochondria in addition to cytosol in rat liver [13]. PIMT was associated with rat cardiac mitochondria by proteomic analysis [14]. PIMT was also identified by immunoblot in both soluble and nuclear fractions of *Xenopus laevis* oocytes [15]. Furthermore, PIMT presence was detected by catalytic activity in rat brain membranes [16] and by immunoblotting in brain cytosol and crude membranes from rat, ox and human [17]. In the latter case, the rat membrane-associated PIMT was released by detergents but was resistant to compounds known to extract peripheral and loosely bound proteins. Recently, it has been reported that mouse brain PIMT was present in protein complexes which co-immunoprecipitated with the microtubule-associated protein 1B (MAP1B) [18] suggesting that PIMT is also associated with the cytoskeleton. Since the primary structure of PIMT predicts a hydrophilic protein, its association with cell compartments such as microsomes, mitochondria and nuclei or its docking to membranes could be mediated through interactions with other proteins to form complexes, as was demonstrated with the MAP1B/PIMT complexes.

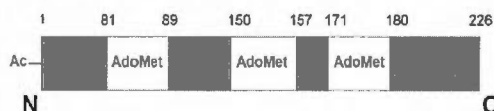


Fig. (2). Schematic structure of human PIMT.

Human PIMT is a small and monomeric protein containing 226 amino acids. The alanine residue at the N-terminal end is modified by acetylation [12]. Three domains for AdoMet binding have also been identified in human PIMT [91].

Table 1. Localization of the Repair Enzyme PIMT in Mammals

Localization	Species	Tissues	Fractions	References
Intracellular	Mammals	All examined	Soluble	[17]
	Human	Brain	Membranes	[17]
	Mice	Brain	Micronbules	[18]
	Rat	Brain	Membranes	[16]
		Heart	Mitochondria	[14]
		Liver	Mitochondria	[13]
			Microsomes	[13]
Extracellular	Human	Brain	Cerebrospinal fluid	[21]
		Breast	Tumor interstitial fluid	[20]
		Blood	Hemodialysis fluid	[19]

Aside from the soluble cell fraction where PIMT is usually found, some studies have reported that the enzyme is also present in other cell compartments as well as outside cells in mammals.

Additionally, proteomic analysis of proteins which have been separated by SDS-PAGE and identified by mass spectrometry has demonstrated that PIMT was among the 292 proteins found in hemodialysis fluid [19]. Similarly, proteomic analysis investigating the proteins secreted in tumor interstitial fluid found that PIMT was differently expressed in patients with breast cancer [20]. Moreover, PIMT was identified in human post-mortem cerebrospinal fluid [21]. Surprisingly, cDNA microarray analysis showed that PIMT mRNA was detected in cell-free amniotic fluid from both euploid and Down syndrome fetuses [22]. These observations indicate that PIMT has a broader tissue distribution spectrum than initially expected (Table 1). In fact, these data support the possibility that the PIMT repair function could be extended to the extracellular environment. The release of PIMT likely occurs *via* its excretion by intact cells or after its liberation by broken cells. These possibilities open new avenues for investigating the repair function of PIMT and improving our understanding of its role in normal and pathological states during aging.

METHYLATION OF ISOMERIZED ASPARTYL RESIDUES BY PIMT SLOWS DOWN THE ACCUMULATION OF ABNORMAL PROTEINS

The methylation activity of PIMT is directed towards L-isoaspartyl and, to a lesser degree, D-aspartyl residues but does not modify other forms such as L-aspartyl or D-isoaspartyl residues [3, 11]. PIMT manifests a broad speci-

ficity for protein substrates and the methylation of L-isoaspartyl residues can repair the polypeptide backbone in damaged proteins (Fig. (1)). For instance, we showed that treatment of type-I collagen isolated from old rats with recombinant PIMT restored cell migration on aged collagen [2]. However, the PIMT capacity to repair proteins is limited by several factors. Firstly, the abnormal aspartyl residues must be located at the protein surface since buried residues are not accessible to PIMT. Secondly, the L-isoaspartyl residues are more efficiently methylated by PIMT than are other altered aspartyl residues. Thirdly, numerous L-isoaspartyl residues arise from the deamidation of L-asparaginyl residues and their methylation by PIMT could transform them to L-aspartyl residues rather than convert them back to the original L-asparaginyl residues. Consequently, the deamidated proteins would now have a repaired peptide backbone but also carry an extra negative charge from L-aspartyl residues. Thus, despite the repair activity of PIMT on several L-isoaspartyl and D-aspartyl residues, there is still a slow but gradual accumulation of non-repaired or partially repaired proteins that could contribute to the molecular dysfunctions found in normal aging and in age-related pathologies.

PIMT IS HIGHLY ABUNDANT IN RAT AND HUMAN BRAINS

Analysis of PIMT in different rat tissues showed that the highest catalytic activity was in brain [23]. In agreement with this, investigation of PIMT expression by immunoblotting demonstrated its presence in all tissues examined with

the highest level in rat brain [17]. PIMT activity is ubiquitous in rat brain regions but is particularly elevated in cortex, hippocampus, hypothalamus and striatum [23-24]. Recent proteomic studies agree with these previous reports, demonstrating that PIMT is highly expressed in different rat brain regions. For instance, PIMT spots were easily visualized by gel staining with colloidal Coomassie Blue and were among the 148 most abundant hippocampal proteins identified in rat [25]. These findings for PIMT in rat hippocampus were recently confirmed by others [26]. Furthermore, immunohistochemical analysis with a PIMT antibody in rat brain showed that the protein was localized mainly in cortex, hippocampus, corpus striatum, thalamus and amygdala [27]. PIMT was one of the down-regulated proteins in the frontal cortex of rats treated with methamphetamine, an addictive psychostimulant drug [28]. In contrast, proteomic analysis demonstrated that PIMT levels increased in the striatum of rats after chronic treatment with the atypical antipsychotic drug risperidone [29].

In human brain, proteomic analysis revealed that PIMT is present in frontal, parietal, temporal and occipital lobes of both brain hemispheres [30]. Another study, using proteomic approaches with biopsy samples obtained from epilepsy surgeries, detected PIMT in superior temporal gyrus [31]. In addition, proteomic technologies allowed the identification of PIMT in the cerebellum of human fetal brain [32]. Interestingly, several proteomic studies have reported that brain PIMT amount was modulated in diseases such as brain tumors [33,34], schizophrenia [35,36] and in corticobasal degeneration, a neurological disorder [37]. Comparative mRNA profiles by cDNA microarray analysis in neurons obtained by laser-capture microdissection from caudate nucleus showed that PIMT mRNA was strongly inhibited in grade I Huntington's disease versus normal brains [38]. Overall, these data indicate that PIMT expression is differently regulated in specific brain regions and that elevated PIMT amounts in particular brain structures suggest that its repair activity of damaged aspartyl residues could be significant for maintaining the physiological functions of these areas during aging.

At the cellular level, an immunohistochemical analysis of PIMT distribution in rat brain showed that the methyltransferase was mainly observed in neurons [27]. Notably, neurons in substantia nigra, locus coeruleus and paraventricular nucleus contained high PIMT levels [39]. Enrichment of cell types from rat brains demonstrated that PIMT activity was also strongly associated with oligodendrocytes but to a lower degree with astrocytes [16]. These reports were supported by an immunohistochemical study showing that rat PIMT was strongly expressed in neurons but also in glial cells and oligodendrocytes [40]. In addition, PIMT was one of the few proteins that were upregulated in transgenic mice overexpressing the inducible transcription factor Zif268 in forebrain neurons [41]. Together, the high PIMT levels in several brain regions and particularly its elevated expression and/or activity in neurons highlight its critical role for neuronal functions.

Interestingly, PIMT enzyme activity has been measured in isolated rat synaptosomes [23] while proteomic studies have identified PIMT in rat cortical synaptosomes [42] and

in human frontal gyrus and occipital cortex synaptosomes [43]. On the other hand, electrophysiological measurements in brain slices from PIMT-deficient mice showed that synaptic transmission is altered within the hippocampus and that the hippocampal CA3 region presented widespread degeneration in mossy fiber terminals [44]. PIMT localization in rat and human synaptosomes and the aberrant synaptic transmission in PIMT-deficient mouse indicate that its down-regulation, with the attendant reduced capacity to repair damaged proteins in synaptosomes, could have marked consequences for neuronal plasticity and synaptic functions during aging. Consequently, PIMT dysregulation in neurons and synaptosomes could favor pathological conditions such as the cognitive impairment and dementia often associated with aging.

SEVERAL KEY PROTEINS IN SYNAPSE FUNCTIONS ARE ISOMERIZED

Early investigations have demonstrated different patterns of PIMT substrates in synaptic membranes from various brain regions in both rat and cattle [45]. More recently, proteomic approaches were applied to brain homogenates from PIMT-deficient mice to identify damaged proteins bearing L-isopropyl residues [46,47]. These studies showed that α -synuclein and β -synuclein, two proteins found in presynaptic nerve terminals, and synapsin I, a protein localized on the cytoplasmic surface of small presynaptic vesicles, were major methylation targets for recombinant PIMT indicating that these proteins were easily isomerized in brain. However, to understand PIMT functions in neuroplasticity, extensive analyses of different subproteomes of isomerized proteins from presynaptic particles, synaptic vesicles, synaptic membranes and postsynaptic densities from both excitatory and inhibitory synapses will be essential in order to clarify, at the molecular level, the relationships between PIMT expression, accumulation of damaged proteins carrying atypical aspartyl residues, synaptic features and the decline of cognitive functions in aging.

Besides its role in presynaptic terminals, α -synuclein has a special relevance in Parkinson's disease. Missense mutations in the α -synuclein gene can cause an inherited form of Parkinson's disease while higher expression of α -synuclein increases the risk of developing sporadic Parkinson's disease [48]. Several studies have shown that aggregated α -synuclein fibrils are the major constituent in Lewy bodies, a pathological hallmark of Parkinson's disease. On the other hand, β -synuclein is usually considered as neuroprotective based on its ability to counteract the α -synuclein aggregation in the brain. However, two missense mutations in β -synuclein have been identified in patients with sporadic and familial Parkinson's disease [49]. Taken together, these data suggest that both α -synuclein and β -synuclein might be involved in the pathogenesis of synucleinopathies and notably in Parkinson's disease. As we noted above, two proteomic studies have demonstrated that α -synuclein and β -synuclein were methyl accepting proteins in brain homogenates from PIMT-deficient mice [46,47]. In addition, it has been reported that wild type and mutated α -synuclein were easily demethylated *in vitro* at 15 asparaginyl residues but primarily at Asn¹⁰³ and Asn¹²² residues [50]. These latter two asparaginyl residues are localized in the disordered carboxyl re-

gion of α -synuclein. Thus, the *in vivo* data from PIMT-deficient mice plus those from the *in vitro* deamidation of α -synuclein suggest that changes in the conformational structures of α -synuclein and β -synuclein arising from the formation of L-isopartyl residues could participate in the generation of insoluble forms of both proteins found in Parkinson's disease and related dementias.

PIMT LEVELS APPEAR TO DECLINE GRADUALLY WHILE PROTEINS WITH ATYPICAL ASPARTYL RESIDUES ACCUMULATE DURING AGING

Although most reports on PIMT have assumed that its main function is to repair damaged proteins, few studies have analyzed the impact of aging on its regulation and activity (Table 2). For instance, a study measuring PIMT activity in rat brain soluble fractions showed an enhancement of 1.5-fold between 3 weeks of life and in adults aged 16 weeks [51]. This was accompanied by a parallel accumulation, by 1.9-fold, in PIMT substrates during this period. Another study with rat brain showed that the PIMT level assessed by immunoblotting in soluble fractions increased about 2-fold

between 2 and 11 weeks after birth then remained unchanged until 55 weeks in old rats [17]. PIMT mRNA levels in whole rat brain and cortical regions assessed by Northern blot analysis, increased gradually from birth until week 21 then declined partially in very old animals aged 107 weeks [24]. Similarly, another study analyzing PIMT mRNA expression by Northern blot in rat brain noted that PIMT transcripts increased about 2.5-fold from birth until the age of 28 weeks then maintained this level up to 96 weeks [40]. Comparison by immunohistochemistry of PIMT levels in dentate gyrus and subiculum showed a higher immunoreactivity in 2 year old rat brains than in those from animals aged 8 weeks [40]. In kidney cortex, PIMT activity in soluble fractions decreased by 30% between rats aged 3 weeks and those aged 2 months, then remained stable for up to 12 months [52]. In rat liver, PIMT activity in the soluble fraction peaked at birth then declined rapidly during the first month and was constant for the next 3 months [51]. Another report showed that hepatic PIMT substrates accumulated strongly, about 8-fold, in rats aged 12 months compared to young rats aged 20 weeks [53].

Table 2. Assessment of PIMT Levels in Old Rat and Human Tissues

Tissues	PIMT (Methods)	Old/Young	Effects	References
RAT TISSUES				
Soluble proteins from brain	Protein (Western blot)	<u>55 weeks</u> 11 weeks	Stable	[17]
Whole brain and cortical region	mRNA (Northern blot)	<u>107 weeks</u> 21 weeks	Declined partially	[24]
Whole brain	mRNA (Northern blot)	<u>96 weeks</u> 28 weeks	Stable	[40]
Dentate gyrus and subiculum	Protein (Immunohistochemistry)	<u>2 years</u> 8 weeks	Increased	[40]
Soluble proteins from kidney cortex	Enzyme activity	<u>12 months</u> 2 months	Stable	[52]
Soluble proteins from liver	PIMT substrates	<u>12 months</u> 20 weeks	Increased by 8-fold	[53]
HUMAN TISSUES				
Soluble proteins from superior parietal cortex	Enzyme activity	<u>88 years</u> 56 years	Increased	[54]
Frontal cortex	mRNA (cDNA microarrays)	<u>> 73 years</u> < 42 years	Decreased by 2.7-fold	[55]
Peripheral lymphocytes	mRNA(cDNA microarrays)	<u>> 70 years</u> < 30 years	Decreased by 3.6-fold	[56]
Lens nuclei	Enzyme activity	<u>62-73 years</u> 3-27 years	Decreased by 2-fold	[57]
Dark brown lens nuclei	Enzyme activity	<u>71-81 years</u> 3-27 years	Decreased by 5-fold	[57]

In humans, fewer data are available regarding the effects of normal aging on PIMT regulation and the accumulation of its substrates (Table 2). Twenty years ago, a study reported that the specific activity of PIMT increased between 56 and 88 years old in soluble proteins prepared from the superior parietal cortex of post mortem brains [54]. In contrast, recent studies have shown that PIMT level appears to decline in human during aging. For instance, a study investigating the regulation of gene expression in the human brain during aging found that PIMT mRNA decreased by 2.7 fold in frontal cortex of people older than 73 years relative to individuals younger than 42 years [55]. In fact, PIMT was among the 4% of about 11000 genes analyzed that were significantly modified by aging [55]. These observations in human frontal cortex are consistent with another report also using cDNA microarray analysis that indicated that PIMT mRNA in peripheral lymphocytes was 3.6-fold lower in individuals older than 70 years than in those younger than 30 years [56].

In lens nuclei, PIMT catalytic activity was significantly decreased, by at least 50%, in individuals aged between 62 and 73 years as compared to those aged between 3 and 27 years [57]. Furthermore, dark brown lens nuclei from individuals aged between 71 and 81 years had a greater loss of PIMT activity, more than 80% reduction, as compared to normal nuclei lenses from people aged between 3 and 27 years [57]. Conversely, methyl acceptor proteins were strongly accumulated in nuclear extracts, at least 10-fold, in both normal old and cataract lenses during aging [57]. In addition, Northern blot quantification in epithelial cells localized in human lenses from normal donors and from cataract patients ranging from 61 to 79 years demonstrated that PIMT mRNA levels were significantly lower, by 32% for the 2.5 kb transcript and by 42% for the 1.7 kb transcript, in cataract lens than in those found in normal age-matched lens [58].

Indeed, long-lived proteins like the lens proteins are good candidates for the formation of L-isoaspartyl residues (Table 2). But, proteins with a shorter half-life are also known to accumulate L-isoaspartyl residues. Despite that synapsin Ia possesses a half-life of about 18 hours [59], it was easily isomerized in mice lacking PIMT [47]. In addition, the turnover of tubulin in rat brain is somewhere between 5 and 15 days [60]. Interestingly, tubulin accumulates rapidly isoaspartyl sites both *in vitro* and in rat PC12 cells incubated with a methyltransferase inhibitor [61]. Both, α -tubulin and β -tubulin were among the major isomerized brain proteins in PIMT-deficient mice [46,47]. Moreover, we reported that β -tubulin was a major isomerized protein in hippocampus of patients suffering of mesial temporal lobe epilepsy [62]. These patients were characterized by a lower (50%) PIMT expression in hippocampus [62]. The stabilization of certain proteins with aging could be another mechanism favoring the accumulation of isomerized proteins. For instance, pulse-chase experiments of α -synuclein in mature neurons showed that its abundance increased by post-translational stabilization during aging [63] and *in vitro* data have shown that α -synuclein was easily deamidated [50]. Together, these observations indicate that it would be relevant to perform proteomic analyses of human brains and other tissues as well to identify isomerized proteins that accumulate during normal aging.

Most data in frontal cortex, lymphocytes and lens nuclei support the assumption for a gradual decrease in PIMT expression in humans during aging (Table 2). However, further investigations will be required to develop a broader and deeper conceptual framework for the essential repair role of PIMT in maintaining brain functions during aging and in protecting against age-related diseases. To reach this goal, a systematic investigation of gene transcription, mRNA stability, protein expression and turnover as well as catalytic activity must be done in specific brain regions, for example in cortex and hippocampus, of an animal model where this enzyme is highly expressed in neurons and is abundant in synaptosomes. These complementary approaches would generate a global picture of how aging regulates PIMT expression and how PIMT dysregulation affects brain performance during aging. The LOU/C/jall rats could be a potential animal model for studying PIMT regulation during brain aging since this strain has been described as a model of healthy aging characterized with a long life expectancy (29-34 months) without developing gross and severe pathologies [64].

PIMT RESPONSE TO HORMONES AND SIGNALING PATHWAYS DURING AGING AND FORMATION OF ISOMERIZED PROTEINS

The decrease in levels of certain hormones during aging, including insulin-like growth factor-I (IGF-I) and estradiol, could result in reduce activation of a variety of signaling pathways and are associated with brain deterioration [65]. It is also known that cell survival signaling pathways such as the MEK/ERK1/2 and Akt/S6K pathways are downregulated in the aged brain [66]. However, sparse data are available on hormones and signaling pathways acting on PIMT in mammals. In addition, nothing is known about how the age-regulated pathways affect PIMT expression. Recently, we reported that PIMT upregulation by the anticonvulsant drug valproic acid is mediated by both the GSK-3/ β -catenin and c-Raf/MEK/ERK/RSK pathways [67,68]. A decline in the activation of these pathways during aging suggests diminished cellular ability to induce PIMT in response to hormone stimulation. The identification of other signaling pathways stimulating or inhibiting PIMT gene transcription is required to allow a better understanding on how aging regulates PIMT quantity and activity.

On the other hand, PIMT was reported to be associated with protein complexes [18]. Thus, using proteomic approaches to assess the dynamic changes in PIMT-interacting proteins, i.e. interactome, would greatly help to understand its regulation during aging. In particular, the identification of PIMT partners in brain would illuminate its critical functions in cognitive processes and how its capacity to repair isomerized proteins could prevent the development of dementias in the elderly.

PROTEIN OXIDATION AND IMPAIRMENT OF PROTEASOME ACTIVITY DURING AGING COULD PROMOTE THE ACCUMULATION OF DAMAGED PROTEINS BEARING L-ISOASPARTYL RESIDUES

Higher amounts of isomerized proteins in aging could result from factors promoting their formation and from con-

ditions decreasing their repair. Proteins are major targets for oxidative damage and the accumulation of oxidized proteins has been associated with aging. Aside from protein oxidation, oxidative stress has been shown to induce the formation of L-isoaspartyl residues in proteins [69]. These authors postulated that the increased protein isomerization dependent on oxidative stress was mediated by rearrangements of protein structure [69]. Moderately oxidized cell proteins are rapidly degraded by the proteasome while heavily oxidized proteins are eliminated by lysosomes [70]. However, proteasomal activity declines during aging [71]. The impaired proteasome activity during human aging would facilitate an accumulation of oxidized and misfolded proteins. Thus, higher rates of protein oxidation conjugated to lower turnover of oxidized proteins could be factors contributing to protein isomerization during aging. Some of these new L-isoaspartyl residues are likely buried within disrupted structures of oxidized proteins thus escaping recognition and repair by PIMT.

Additionally, it also remains to determine whether accumulation of isomerized proteins during aging reflects less efficient enzyme activity since PIMT can undergo damaging non-enzymatic post-translational modifications including formation of L-isoaspartyl residues in its structure, as has been demonstrated *in vitro* [72], and likely by oxidation as well. Thus, molecular aging by accumulation of damaged proteins carrying L-isoaspartyl residues probably result from both an increase in the generation of isomerized proteins as well as by a decline in the repair activity of PIMT, leading to formation of protein aggregates that eventually induce cellular dysfunctions.

POLYMORPHISM IN PIMT AND AGING

The human PIMT protein is polymorphic at the 119th amino acid. Characterization of the catalytic activity of the Ile¹¹⁹ and Val¹¹⁹ isoforms in red blood cell lysates indicated that the Ile¹¹⁹ isoform has higher thermostability and specific activity while the Val¹¹⁹ isoform possessed a greater substrate affinity [73]. Molecular dynamic simulations have shown that the Ile¹¹⁹ isoform catalyzes the methylation reaction but appears to have difficulties recognizing specific substrates [74]. When the Ile/Val alleles of PIMT were compared in the Ashkenazi Jewish population between older people (average age : 87.2 years) and younger ones (average age : 36.2 years), it was observed that 65% of the older population had a heterozygous genotype compared to 45% in younger control group [73]. Thus, it appears advantageous to have both PIMT isoforms for preventing the accumulation of isomerized proteins during aging. But, further biochemical and epidemiological investigations in various populations would be required to demonstrate whether PIMT heterozygosity is advantageous over homozygosity for promoting longevity.

PROTEINS CARRYING L-ISOASPARTYL RESIDUES AND PIMT IN ALZHEIMER'S DISEASE

Alzheimer's disease is the most common form of dementia in the elderly. At the molecular level, this disease is characterized by the formation of extracellular amyloid deposits or plaques and by intraneuronal neurofibrillary tangles. The

primary component of senile plaques is β -amyloid (A β) peptide while the neurofibrillary tangles mainly consist of protein aggregates of hyperphosphorylated tau and ubiquitin. In addition to hyperphosphorylation, tau in neurofibrillary tangles is also known to be isomerized at Asp¹⁹³ and Asp³⁸⁷ and deamidated at Asn³⁸¹ [75,76]. An *in vitro* measurement of proteins with abnormal aspartyl residues in cortex from Alzheimer brains found a decrease of about 25% as compared to normal tissues [77]. This reduced *in vitro* methylation in Alzheimer samples was interpreted as the result of a greater methylation rate of altered aspartyl residues in living brain [77]. In contrast, proteins associated with neurofibrillary tangle preparations isolated from Alzheimer brains contained about twice as many methyl accepting proteins than did the surrounding gray matter and 1.5-fold more than did similar preparations from control brains [78]. These two reports demonstrate an accumulation of altered aspartyl residues in Alzheimer's disease but, in contrast to those present in whole cortex, the altered aspartyl residues in neurofibrillary tangles were not easily repaired by PIMT. Furthermore, *in vitro* methylation reactions in isolated neurofibrillary tangles represents a minimum amount of altered aspartyl residues in tau and in other proteins since PIMT could have some difficulty in recognizing all altered aspartyl residues in protein aggregates. However, it remains to be established whether these altered aspartyl residues in these proteins are a cause or a result of Alzheimer's disease.

When PIMT specific activity and methyl-accepting proteins were quantified in soluble fractions from parietal cortex, no significant differences were seen between Alzheimer patients and appropriate controls [54]. In contrast, gene expression profiles in hippocampal autopsy samples using cDNA microarrays showed that PIMT mRNA was strongly reduced, ~2-fold, in Alzheimer specimens versus controls [79]. But ribonuclease protection analysis of PIMT mRNA abundance in Alzheimer brains demonstrated a 1.5-fold increase of transcript level relative to controls [80]. These apparently contradictory data may reflect the different methodological approaches used to assess PIMT in Alzheimer's disease. For instance, the absence of variation in PIMT activity and methyl-accepting proteins in parietal cortex between Alzheimer patients and controls [54] is probably due to the fact that analyses were performed in whole cortical samples. Although potentially interesting, the decreased PIMT mRNA observed by cDNA microarrays [79] and its increased level seen by ribonuclease protection analysis [80] in Alzheimer patients need to be validated by another method like real-time PCR.

Immunohistochemical techniques demonstrated that degenerating neurons in Alzheimer brains were characterized by a stronger immunostaining for PIMT in the cytoplasm [76]. These observations were supported by other immunohistochemical analyses showing that PIMT was associated with neurofibrillary tangles [80] and that a PIMT antibody stained the outer structure of neurofibrillary tangles [76]. Together, these immunohistochemical results support the hypothesis that PIMT is relocated toward neurofibrillary tangles, possibly in an attempt to repair altered aspartyl residues present in tau aggregates, a hallmark of Alzheimer's disease.

Using animal models of Alzheimer's disease [81] which overexpress or not PIMT would allow testing the hypothesis that PIMT redistribution to neurofibrillary tangles is to repair the damaged tau carrying atypical aspartyl residues. Notably, the constitutive PIMT overexpression in an animal model of Alzheimer's disease would help to determine whether this repair enzyme could prevent the formation of altered aspartyl residues in tau and other proteins, thus decreasing protein aggregation and neuronal death. In addition, an animal model expressing an inducible PIMT gene that is activated only at latter stages, when neurofibrillary tangles are already formed, would demonstrate whether PIMT's ability to repair isomerized tau might reduce the progression of Alzheimer's disease. These animal models could also serve to explore the molecular mechanisms triggering PIMT redistribution toward neurofibrillary tangles in degenerating neurons in Alzheimer's disease.

Besides tau, the A β ¹⁻⁴² peptides that accumulate in cortical neuritic plaques and A β ¹⁻⁴⁰ peptides in the walls of cerebral vasculature in Alzheimer brains undergo isomerization and racemization [review in 76]. For instance, A β peptides isolated from compact amyloid cores of neuritic plaques from Alzheimer brains contained altered aspartyl residues at positions 1 and 7 which were mostly L-isoaspartyl residues [82]. Similarly, A β peptides from the leptomeningeal microvasculature possessed the same structural alterations due to isomerization at Asp¹ and deamidation at Asn⁷ [82]. Furthermore, immunological studies by immunohistochemistry and Western blot analyses demonstrated that antibodies developed against A β peptides carrying L-isoaspartyl residues at positions 7 or 23 recognized almost all plaques in hippocampus and blood vessels from Alzheimer brains that were stained by an antibody against A β peptides [83]. Another immunohistochemical analysis using an antibody directed against a synthetic A β peptide with an L-isoaspartyl residue at position 7 showed that isomerized amyloid plaques were easily detected in frontal cortex as clustered deposits with a widespread distribution while in hippocampus the distribution was more even but also widespread [84]. Unlike cortex and hippocampus, isomerized amyloid plaques were poorly detected in cerebellum [84]. These amyloid plaques were often positive for thioflavin as is typically found in mature plaques indicating that isomerization of A β peptides at position 7 occurs when A β peptides are converted to a fibril form [84]. It was also observed that some isomerized amyloid plaques were associated with activated microglia [84]. Quantitative image analysis demonstrated that the amount of isomerized amyloid plaques was correlated with dementia severity in Alzheimer brains [84]. This latter result agrees with another report showing that isomerized A β peptides are preferentially localized in the cores of mature plaques when frontal cortex of Alzheimer brains were probed with an antibody that recognized A β peptides isomerized at both positions 1 and 7 [85]. Similarly, immunohistochemical analysis using an A β antibody active against [D-Asp⁷, D-Asp²³] racemized A β ¹⁻³⁵ peptides further revealed that racemized A β peptides were also present in senile plaques of Alzheimer brains [86]. As expected, immunohistochemical analysis did not detect PIMT in senile plaques [76] since the repair enzyme is usually present intracellularly (Table 1).

In vitro assays were performed with synthesized A β peptides carrying different modified aspartyl residues in their sequence to elucidate their contribution to aggregation properties. In contrast to control peptides and A β ¹⁻⁴² peptides with L-isoaspartyl residues at position 7, those isomerized at position 23 clearly manifested a higher aggregation rate [83]. In addition, in A β ¹⁻⁴⁰ peptides incubated with zinc to promote their aggregation, those with L-isoaspartyl residues at position 23 aggregated rapidly compared to control peptides and to peptides isomerized at position 7 [83]. In A β ¹⁻⁴⁰ peptides where L-Asp residues were changed for D-Asp residues, the aggregation was accelerated in D-Asp⁷ and D-Asp²³ peptides versus the control peptides [86]. Furthermore, in A β ¹⁻³⁵ peptides where D-Asp residues were substituted for L-Asp residues, racemization of Asp²³ promoted peptide aggregation and fibril formation while racemization of Asp⁷ delayed the signs of aggregation [87]. Thus, racemization of L-Asp⁷ into D-Asp⁷ in A β ¹⁻⁴⁰ peptides increased the aggregation rate but had the opposite effect in A β ¹⁻³⁵ peptides. These results demonstrate that both isomerization and racemization of L-Asp residues in most A β peptides could affect their insolubility and aggregation in amyloid plaques.

A β peptides are derived by proteolytic cleavage of the extracellular region from the membrane protein β -amyloid precursor protein (APP) [88]. Since A β peptides isomerized at Asp¹ were found in aggregated amyloid plaques and since formation of L-isoaspartyl residues is possible within a peptide chain only, these findings indicate that protein isomerization occurs prior to APP cleavage by β -secretase. BACE-1 is the major β -secretase in the brain. Interestingly, isomerization of Asp residues at the β -secretase cleavage site resulted in loss of BACE-1 activity on the protein APP but had no effect on the activity of cathepsin B, another protease acting as a β -secretase [89]. In fact, cathepsin B cleaved isomerized A β peptides faster than their normal counterparts [89]. Interestingly, cathepsin B levels are known to be markedly elevated in Alzheimer's disease [90]. These data suggest that formation of L-isoaspartyl residues could take place gradually in human APP during brain aging and that isomerization of APP could facilitate its proteolysis by cathepsin B leading to the release of A β peptides carrying N-terminal L-isoaspartyl residues.

CONCLUSIONS

Accumulation of damaged proteins carrying abnormal aspartyl residues in their structure appears to be a hallmark of aging. In particular, gradually increasing levels of isomerized proteins in neurons could affect, to various degrees, several biochemical processes in human brain and synaptic plasticity. Over time, the increase of isomerized proteins could eventually contribute to the progressive decline of cognitive functions with age and probably could participate to the progression of many neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada to R. R. Desrosiers.

REFERENCES

- [1] Cloos PA and Christgau S. Post-translational modifications of proteins: implications for aging, antigen recognition, and autoimmunity. *Biogerontology* 2004; 5(3): 139-58.
- [2] Lanthier J and Desrosiers RR. Protein L-isoaspartyl methyltransferase repairs abnormal aspartyl residues accumulated *in vivo* in type-I collagen and restores cell migration. *Exp Cell Res* 2004; 293: 96-105.
- [3] Clarke S. Aging as war between chemical and biochemical processes: protein methylation and the recognition of age-damaged proteins for repair. *Ageing Res Rev* 2003; 2(3): 263-85.
- [4] Shimizu T, Masuoka Y and Shirasawa T. Biological significance of isoaspartate and its repair system. *Biol Pharm Bull* 2004; 28: 1590-96.
- [5] Gupta R and Srivastava OP. Effect of deamidation of asparagine 146 on functional and structural properties of human lens alphaB-crystallin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(1): 206-14.
- [6] Gupta R and Srivastava OP. Deamidation affects structural and functional properties of human alphaA-crystallin and its oligomerization with alphaB-crystallin. *J Biol Chem* 2004b; 279(43): 44258-69.
- [7] Sharma KK and Santhoshkumar P. Lens aging: effects of crystallins. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790(10): 1095-108.
- [8] Kinzel V, König N, Pipkorn R, Bossemeyer D and Lehmann WD. The amino terminus of PKA catalytic subunit—a site for introduction of posttranslational heterogeneities by deamidation: D-Asp2 and D-isoAsp2 containing isozymes. *Protein Sci* 2000; 9(11): 2269-77.
- [9] Pepperkok R, Hotz-Wagenblatt A, König N, Girod A, Bossemeyer D and Kinzel V. Intracellular distribution of mammalian protein kinase A catalytic subunit altered by conserved Asn2 deamidation. *J Cell Biol* 2000; 148(4): 715-26.
- [10] Curcio F, Longhi R, Crappa L, Cattaneo A, Dondossola E, Bachi A, et al. Spontaneous formation of L-isoaspartate and gain of function in fibroectin. *J Biol Chem* 2006; 281(47): 36466-76.
- [11] Reissner, KJ and Aswad DW. Deamidation and isoaspartate formation in proteins: unwanted alterations or surreptitious signals? *Cell Mol Life Sci* 2003; 60(7): 1281-95.
- [12] Ingrosso D, Fowler AV, Bleibaum J and Clarke S. Sequence of the D-aspartyl/L-isoaspartyl protein methyltransferase from human erythrocytes. Common sequence motifs for protein, DNA, RNA, and small molecule S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *J Biol Chem* 1989; 264(33): 20131-39.
- [13] Kharabanda KK, Maillard ME, Baldwin CR, Sorrell MF and Tuma DF. Accumulation of proteins bearing atypical isoaspartyl residues in livers of alcohol-fed rats is prevented by betaine administration: effects on protein-L-isoaspartyl methyltransferase activity. *J Hepatol* 2007; 46(6): 1119-25.
- [14] Perlman DH, Bauer SM, Ashrafian H, Bryan NS, Garcia-Saura MF, Liu CC, et al. Mechanistic insights into nitrite-induced cardioprotection using an integrated metabolomic/proteomic approach. *Circ Res* 2009; 104(6): 796-804.
- [15] O'Connor CM. Regulation and subcellular distribution of a protein methyltransferase and its damaged aspartyl substrate sites in developing *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 1987; 262(21): 10398-403.
- [16] Sellinger OZ, Kramer CM, Fischer-Bovenkerk C and Adams CM. The characterization of a membrane-bound protein carboxymethylation system in brain. *Neurochem Int* 1987; 10(2): 155-66.
- [17] Boivin D, Bilodeau D and Béliveau R. Immunohistochemical characterization of L-isoaspartyl-protein carboxyl methyltransferase from mammalian tissues. *Biochem J* 1995; 309(Pt 3): 993-8.
- [18] Cueille N, Blanc CT, Riederer IM and Riederer BM. Microtubule-associated protein 1B binds glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Proteome Res* 2007; 6(7): 2640-7.
- [19] Molina H, Bunkenborg J, Reddy GH, Muthusamy B, Scheel PJ and Pandey A. A proteomic analysis of human hemodialysis fluid. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4(5): 637-50.
- [20] Cortesi L, Barchetti A, De Manes E, Rossi E, Della Casa L, Marcheselli L, et al. Identification of protein clusters predictive of response to chemotherapy in breast cancer patients. *J Proteome Res* 2009; 8(11): 4916-33.
- [21] Burgess JA, Lescuyer P, Hainard A, Burkhard PR, Turck N, Michel P, et al. Identification of brain cell death associated proteins in human post-mortem cerebrospinal fluid. *J Proteome Res* 2006; 5(7): 1674-81.
- [22] Slonim DK, Koide K, Johnson KL, Tantravahi U, Cowan JM, Jarrah Z, et al. Functional genomic analysis of amniotic fluid cell-free mRNA suggests that oxidative stress is significant in Down syndrome fetuses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(23): 9425-9.
- [23] Diliberto EJ Jr and Axelrod J. Regional and subcellular distribution of protein carboxymethylase in brain and other tissues. *J Neurochem* 1976; 26(6): 1159-65.
- [24] Mizobuchi M, Murao K, Takeda R and Kakimoto Y. Tissue-specific expression of isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase gene in rat brain and testis. *J Neurochem* 1994; 62(1): 322-8.
- [25] Fountoulakis M, Tsangaris GT, Maris A and Lubec G. The rat brain hippocampus proteome. *Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2005; 819(1): 115-29.
- [26] Marais L, Hattingh SM, Stein DJ and Daniels WM. A proteomic analysis of the ventral hippocampus of rats subjected to maternal separation and escitalopram treatment. *Metab Brain Dis* 2009; 24(4): 569-86.
- [27] Billingsley ML, Kim S and Kuhn DM. Immunohistochemical localization of protein-O-carboxylmethyltransferase in rat brain neurons. *Neuroscience* 1985; 15(1): 159-71.
- [28] Faure JJ, Hattingh SM, Stein DJ and Daniels WM. Proteomic analysis reveals differentially expressed proteins in the rat frontal cortex after methamphetamine treatment. *Metab Brain Dis* 2009; 24(4): 685-700.
- [29] O'Brien E, Dedova I, Duffy L, Cordwell S, Karl T and Matsumoto I. Effects of chronic risperidone treatment on the striatal protein profiles in rats. *Brain Res* 2006; 1113(1): 24-32.
- [30] Pozzi Mucelli S, Odreman F, Gonzales ML, Gerardi E, Staata G and Vindigni A. Proteomic studies on the white matter of human brain. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2006; 833(1): 80-90.
- [31] Dumont D, Noben JP, Verhaert P, Stinissen P and Robben J. Gel-free analysis of the human brain proteome: application of liquid chromatography and mass spectrometry on biopsy and autopsy samples. *Proteomics* 2006; 6(18): 4967-77.
- [32] Fountoulakis M, Juranville JF, Dierssen M and Lubec G. Proteomic analysis of the fetal brain. *Proteomics* 2002; 2(11): 1547-76.
- [33] Odreman F, Vindigni A, Gonzales ML, Nicolini B, Candiano G, Zanotti B, et al. Proteomic studies on low- and high-grade human brain astrocytomas. *J Proteome Res* 2005; 4(3): 696-708.
- [34] Khalil AA. Biomarker discovery: a proteomic approach for brain cancer profiling. *Cancer Sci* 2007; 98(2): 201-13.
- [35] Martins-de-Souza D, Gattaz WF, Schlatt A, Maccarrone G, Husaydi-Gulyás E, Eberlin MN, et al. Proteomic analysis of dorsolateral prefrontal cortex indicates the involvement of cytoskeleton, oligodendrocyte, energy metabolism and new potential markers in schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2009; 43(11): 978-86.
- [36] English JA, Dicker P, Föcking M, Dunn MJ and Cotter DR. 2-D DIGE analysis implicates cytoskeletal abnormalities in psychiatric disease. *Proteomics* 2009; 9(12): 3368-82.
- [37] Chen W, Ji J and Ru B. Proteomic analysis of corticobasal degeneration: a case study of corticobasal degeneration at the proteome level. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2005; 17(3): 364-71.
- [38] Hodges A, Strand AD, Aragaki AK, Kuhn A, Sengstad T, Hughes G, et al. Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Hum Mol Genet* 2006; 15(6): 965-77.
- [39] Billingsley ML and Balaban CD. Protein-O-carboxylmethyltransferase in the rat brain: high regional levels in the substantia nigra, locus coeruleus and paraventricular nucleus. *Brain Res* 1985; 358(1-2): 96-103.
- [40] Shirasawa T, Endoh R, Zeng YX, Sakamoto K and Mori H. Protein L-isoaspartyl methyltransferase: developmentally regulated gene expression and protein localization in the central nervous system of aged rat. *Neurosci Lett* 1995; 188(1): 37-40.
- [41] Baumgärtel K, Tweedie-Cullen RY, Grossmann J, Gehrig P, Livingston-Zatchej M and Mansuy IM. Changes in the proteome after neuronal zif268 overexpression. *J Proteome Res* 2009; 8(7): 3298-316.
- [42] Witzmann FA, Arnold RJ, Bai F, Hrnčirova P, Kimpel MW, Mechref YS, et al. A proteomic survey of rat cerebral cortical synaptosomes. *Proteomics* 2005; 5(8): 2177-201.
- [43] Eberhardt N, Lewohl JM, Mayfield RD, Harris RA and Dodd PR. Synaptic proteome changes in the superior frontal gyrus and occipital cortex of the alcoholic brain. *Proteomics Clin Appl* 2009; 3(6): 730-42.

- [44] Ikegaya Y, Yanada M, Fukuda T, Kuroyanagi H, Shirasawa T and Nishiyama N. Aberrant synaptic transmission in the hippocampal CA3 region and cognitive deterioration in protein-repair enzyme-deficient mice. *Hippocampus* 2001; 11(3): 287-98.
- [45] Johnson BA and Aswad DW. Identification and topography of substrates for protein carboxyl methyltransferase in synaptic membrane and myelin-enriched fractions of bovine and rat brain. *J Neurochem* 1985; 45(4): 1119-27.
- [46] Vigneswara V, Lowenson JD, Powell CD, Thakur M, Bailey K, Clarke S, *et al.* Proteomic identification of novel substrates of a protein isoaspartyl methyltransferase repair enzyme. *J Biol Chem* 2006; 281(43): 32619-29.
- [47] Zhu JX, Doyle HA, Mamula MJ and Aswad DW. Protein repair in the brain: proteomic analysis of endogenous substrates for protein L-isoaspartyl methyltransferase in mouse brain. *J Biol Chem* 2006; 281(44): 33802-13.
- [48] Cookson MR. alpha-Synuclein and neuronal cell death. *Mol Neurodegener* 2009; 4: 9.
- [49] Ohtake H, Limprasert P, Fan Y, Onodera O, Kakita A, Takahashi H, *et al.* Beta-synuclein gene alterations in dementia with Lewy bodies. *Neurology* 2004; 63(5): 805-11.
- [50] Robinson NE, Robinson ML, Schulze SE, Lai BT and Gray HB. Deamidation of alpha-synuclein. *Protein Sci* 2009; 18(8): 1766-73.
- [51] Hye-Ryan L and Gil-Ja J. Age-Related Changes of Protein Carboxyl Methylation in Rat Brain and Liver. *Korean Biochem J* 1991; 24(1): 65-70.
- [52] Pelletier J, Desrosiers RR and Béliveau R. Age-related changes in carboxyl methylation of proteins in the kidney. *Mech Ageing Dev* 1996; 86(2): 115-33.
- [53] Ghandour H, Liu BF, Choi SW, Mason JB and Selhub J. Folate status and age affect the accumulation of L-isoaspartyl residues in rat liver proteins. *J Nutr* 2002; 132(6): 1357-60.
- [54] Johnson BA, Shirokawa JM, Geddes JW, Choi BH, Kim RC and Aswad DW. Protein L-isoaspartyl methyltransferase in postmortem brains of aged humans. *Neurobiol Aging* 1991; 12(1): 19-24.
- [55] Lu T, Pan Y, Kao SY, Li C, Kohane I, Chan J, *et al.* Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature* 2004; 429(6994): 883-91.
- [56] Visala Rao D, Boyle GM, Parsons PG, Watson K and Jones GL. Influence of ageing, heat shock treatment and *in vivo* total antioxidant status on gene-expression profile and protein synthesis in human peripheral lymphocytes. *Mech Ageing Dev* 2003; 124(1): 55-69.
- [57] McFadden PN and Clarke S. Protein carboxyl methyltransferase and methyl acceptor proteins in aging and cataractous tissue of the human eye lens. *Mech Ageing Dev* 1986; 34(1): 91-105.
- [58] Kodama T, Mizobuchi M, Takeda R, Tonikai H, Shinomiya H and Ohashi Y. Hampered expression of isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase gene in the human cataractous lens. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1245(2): 269-72.
- [59] Christopher D and Edward BZ. Post-Transcriptional Regulation of Synaptic Vesicle Protein Expression and the Developmental Control of Synaptic Vesicle Formation. *J Neurosci* 1997; 17(7): 2365-75.
- [60] Safaei R and Fischer I. Turnover of cytoskeletal proteins *in vivo*. *Brain Res* 1990; 533(1): 83-90.
- [61] Najbauer J, Orszeski J and Aswad DW. Molecular Aging of Tubulin: Accumulation of Isoaspartyl Sites *In Vivo* and *In Vitro*. *Biochemistry* 1996; 35(16): 5183-90.
- [62] Lanthier J, Bouthillier A, Lapointe M, Demeule M, Béliveau R and Desrosiers RR. Down-regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase in human epileptic hippocampus contributes to generation of damaged tubulin. *J Neurochem* 2002; 83(3): 581-91.
- [63] Li W, Lesuisse C, Xu Y, Troncoso JC, Price DL, Lee MK. Stabilization of alpha-synuclein protein with aging and familial parkinson's disease-linked A53T mutation. *J Neurosci* 2004; 24(33): 7400-9.
- [64] Perna D, Soulage C, Pequignot JM and Gélou A. Resistance to obesity in Low-C rats prevents ageing-associated metabolic alterations. *Diabetologia* 2003; 46(11): 1489-96.
- [65] García-Segura LM, Diz-Chaves Y, Pérez-Martín M and Damaudéry M. Estradiol, insulin-like growth factor-I and brain aging. *Psychoneuroendocrinology* 2007; 32(Suppl 1): S57-61.
- [66] Jin Y, Yan EZ, Li XM, Fan Y, Zhao YJ, Liu Z, *et al.* Neuroprotective effect of sodium ferulate and signal transduction mechanisms in the aged rat hippocampus. *Acta Pharmacol Sin* 2008; 29(12): 1399-408.
- [67] Lamarre M and Desrosiers RR. Up-regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase expression by lithium is mediated by glycogen synthase kinase-3 inactivation and beta-catenin stabilization. *Neuropharmacology* 2008; 55(5): 669-76.
- [68] Cournoyer P and Desrosiers RR. Valproic acid enhances protein L-isoaspartyl methyltransferase expression by stimulating extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Neuropharmacology* 2009; 56(5): 839-48.
- [69] D'Angelo S, Ingrosso D, Migliardi V, Sorrentino A, Donnarumma G, Baroni A, *et al.* Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radic Biol Med* 2005; 38(7): 908-19.
- [70] Dunlop RA, Brunk UT and Rodgers KJ. Oxidized proteins: mechanisms of removal and consequences of accumulation. *IUBMB Life* 2009; 61(5): 522-7.
- [71] Chondrogianni N and Gonos ES. Proteasome dysfunction in mammalian aging: steps and factors involved. *Exp Gerontol* 2005; 40(12): 931-8.
- [72] Lindquist JA and McFadden PN. Automethylation of protein (D-aspartyl/L-isoaspartyl) carboxyl methyltransferase, a response to enzyme aging. *J Protein Chem* 1994; 13(1): 23-30.
- [73] DeVry CG and Clarke S. Polymorphic forms of the protein L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase involved in the repair of age-damaged proteins. *J Hum Genet* 1999; 44(5): 275-88.
- [74] Rutherford K and Daggett V. The V119I polymorphism in protein L-isoaspartate O-methyltransferase alters the substrate-binding interface. *Protein Eng Des Sel* 2009; 22(12): 713-21.
- [75] Watanabe A, Takio K and Ihara Y. Deamidation and isoaspartate formation in smeared tau in paired helical filaments. Unusual properties of the microtubule-binding domain of tau. *J Biol Chem* 1999; 274(11): 7368-78.
- [76] Shimizu T, Watanabe A, Ogawara M, Mori H and Shirasawa T. Isoaspartate formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys* 2000; 381(2): 225-34.
- [77] Goggins M, Scott JM and Weir DG. Methylation of cortical brain proteins from patients with HIV infection. *Acta Neurol Scand* 1999; 100(5): 326-31.
- [78] Payan LL, Chou SJ, Fisher GH, Man EH, Emory C and Frey WH 2nd. Altered aspartate in Alzheimer neurofibrillary tangles. *Neurochem Res* 1992; 17(2): 187-91.
- [79] Joseph S, Robbins K, Zhang W and Reikaya R. Effects of misdiagnosis in input data on the identification of differential expression genes in incipient Alzheimer patients. *In Silico Biol* 2008; 8(5-6): 545-54.
- [80] Kondo T, Shirasawa T, Itoyama Y and Mori H. Embryonic genes expressed in Alzheimer's disease brains. *Neurosci Lett* 1996; 209(3): 157-60.
- [81] Götz J and Götz NN. Animal models for Alzheimer's disease and frontotemporal dementia: a perspective. *ASN Neuro* 2009; 1(4): 251-64.
- [82] Røhr AE, Lowenson JD, Clarke S, Wolkow C, Wang R, Correr RJ, *et al.* Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 1993; 268(5): 3072-83.
- [83] Shimizu T, Fukuda H, Murayama S, Iizumiya N and Shirasawa T. Isoaspartate formation at position 23 of amyloid beta peptide enhanced fibril formation and deposited onto senile plaques and vascular amyloids in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 2002; 70(3): 451-61.
- [84] Fonseca MI, Head E, Velazquez P, Cotman CW and Tenner AJ. The presence of isoaspartic acid in beta-amyloid plaques indicates plaque age. *Exp Neurol* 1999; 157(2): 277-88.
- [85] Hosoda R, Saido TC, Orvos L Jr, Arni T, Mann DM, Lee VM, *et al.* Quantification of modified amyloid beta peptides in Alzheimer disease and Down syndrome brains. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57(11): 1089-95.
- [86] Mori H, Ishii K, Tomiyama T, Furiya Y, Sahara N, Asano S, *et al.* Racemization: its biological significance on neuropathogenesis of Alzheimer's disease. *Tohoku J Exp Med* 1994; 174(3): 251-62.
- [87] Tomiyama T, Asano S, Furiya Y, Shirasawa T, Endo N and Mori H. Racemization of Asp23 residue affects the aggregation properties of Alzheimer amyloid beta protein analogues. *J Biol Chem* 1994; 269(14): 10205-8.

- [88] Chow VW, Mattson MP, Wong PC and Gleichmann M. An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromol Med* 2010; 12(1): 1-12.
- [89] Bohme L, Bar JW, Hoffmann T, Manhart S, Ludwig HH, Rosche F, *et al.* Isoaspartate residues dramatically influence substrate recognition and turnover by proteases. *Biol Chem* 2008; 389(8): 1043-53.
- [90] Haque A, Banik NL and Ray SK. New insights into the roles of endolysosomal cathepsins in the pathogenesis of Alzheimer's disease: cathepsin inhibitors as potential therapeutics. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2008; 7(3): 270-7.
- [91] Kagan RM and Clarke S. Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch Biochem Biophys* 1994; 310(2): 417-27.

Received: July 6, 2009

Revised: September 9, 2010

Accepted: November 2, 2010

ANNEXE IV

LISTE DES PRÉSENTATIONS À DES COLLOQUES ET À DES CONGRÈS SCIENTIFIQUES

Fanélus, I. et Desrosiers, R. R. «Active protein L-isoaspartyl methyltransferase multimers in mitochondria upon mitochondrial impairment-induced reactive oxygen species». **The 3rd IRCM Meeting on Systems Biology: Molecular Networks**. Montreal, Canada, October 26-27, 2010 (affiche).

Fanélus I and Desrosiers R. R. «Protein L-isoaspartyl methyltransferase protects against reactive oxygen species generated by thiol-modifying phenylarsine oxide in U-87 human astrogloma cells». **13th Congress of the International Association of Biomedical Gerontology (I.A.B.G)**. Quebec, Canada, May 18-20, 2009 (orale).

Fanélus I et Desrosiers R. R. «L'expression de la protéine L-isoaspartate méthyltransférase est stimulée par les espèces oxygénées réactives induites par le phénylarsine oxyde». **76^e Congrès de l'Acfas**. Québec, Canada, 5-9 mai 2008 (orale).

Fanélus I et Desrosiers R. R. «L'expression de la protéine L-isoaspartate méthyltransférase est stimulée par les espèces oxygénées réactives induites par le phénylarsine oxyde». **4^e Colloque annuel du Centre de Recherches Biomédicales**. Montréal, Canada, 30 avril 2008 (orale).

Fanélus I et Desrosiers R. R. «Le phénylarsine oxyde induit l'expression de la PIMT dans les glioblastomes». **2^e Congrès international sur la chaîne des médicaments**. Montréal, Canada, 14-17 octobre 2007 (orale).

Fanélus I and Desrosiers R. R. «The expression of protein L-isoaspartyl méthyltransferase in human glioblastoma is dependent on mTOR». **50th Annual Meeting and Conference of the Canadian Society of Biochemistry, Molecular and Cellular Biology (CSBMCB)**. Montreal, Canada, July 5-9, 2007 (affiche)

Fanélus, I. et Desrosiers, R. R. «L'expression de la protéine L-isoaspartate méthyltransférase dans les glioblastomes humains est dépendante de la kinase mTOR». **74^e Congrès de l'Acfas**. Montréal, Canada, 17 mai 2006 (orale).

ANNEXE V

RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES OBTENUS AU COURS DU DOCTORAT

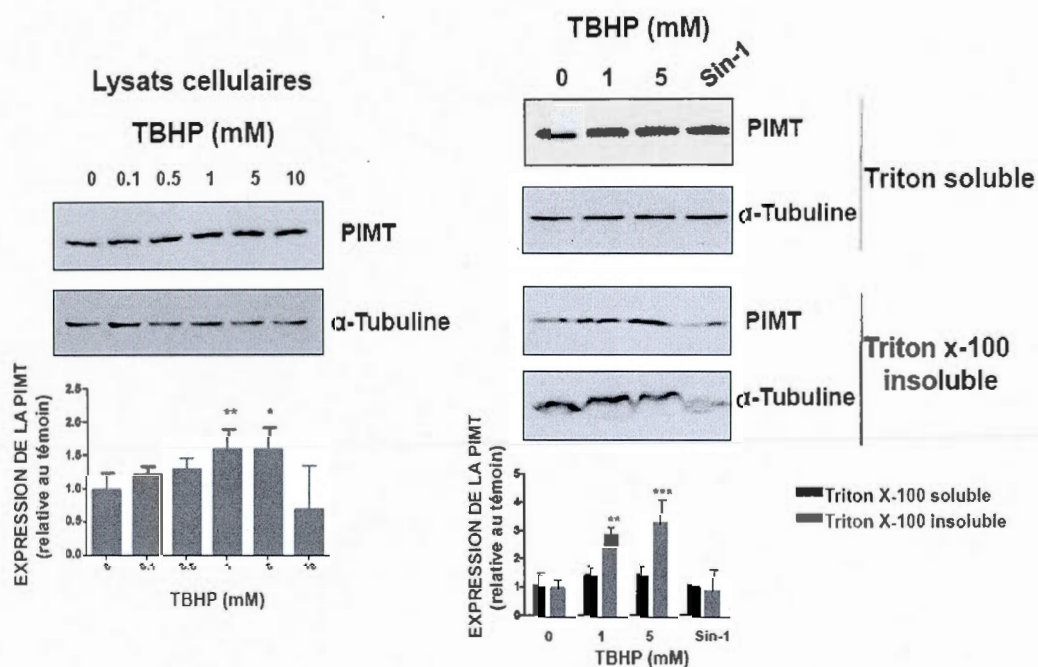


Figure 1.1 Le TBHP stimule l'expression de la PIMT associée à la fraction protéique insoluble au Triton X-100 dans les cellules U87. La fraction Triton X-100 insoluble est enrichie en protéines cytosquelettiques, en protéines nucléaires et en caveolae.

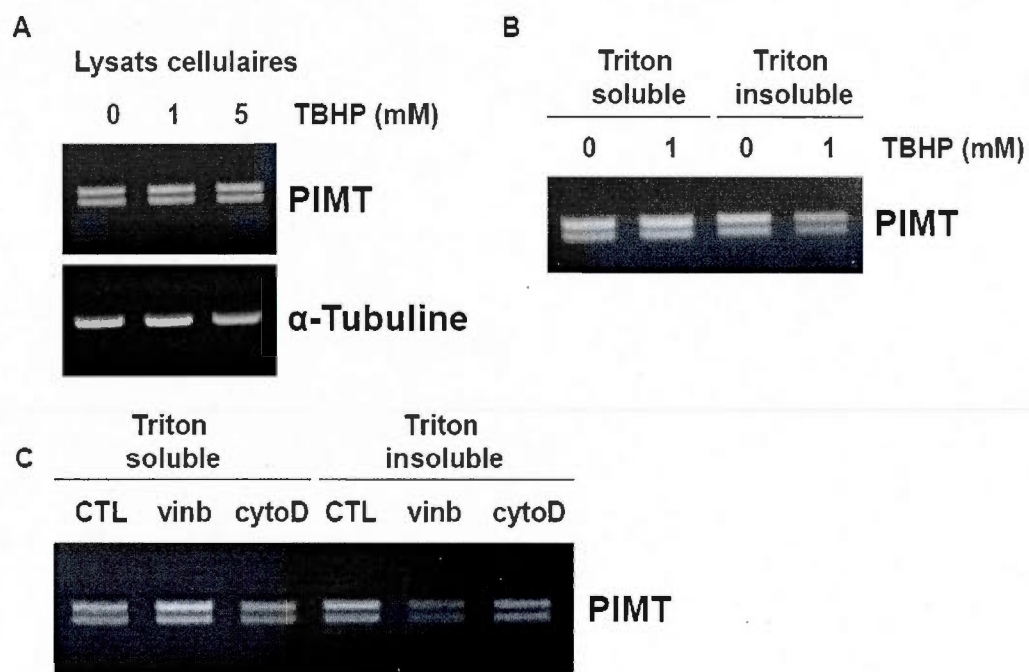


Figure 1.2 L'ARNm de la PIMT est présent au niveau de la fraction Triton X-100 insoluble dans les cellules U87. La vinblastine (vinb) est un inhibiteur de l'assemblage des microtubules, tandis que la cytochalasine D (cytoD) est inhibiteur de la polymérisation de l'actine.

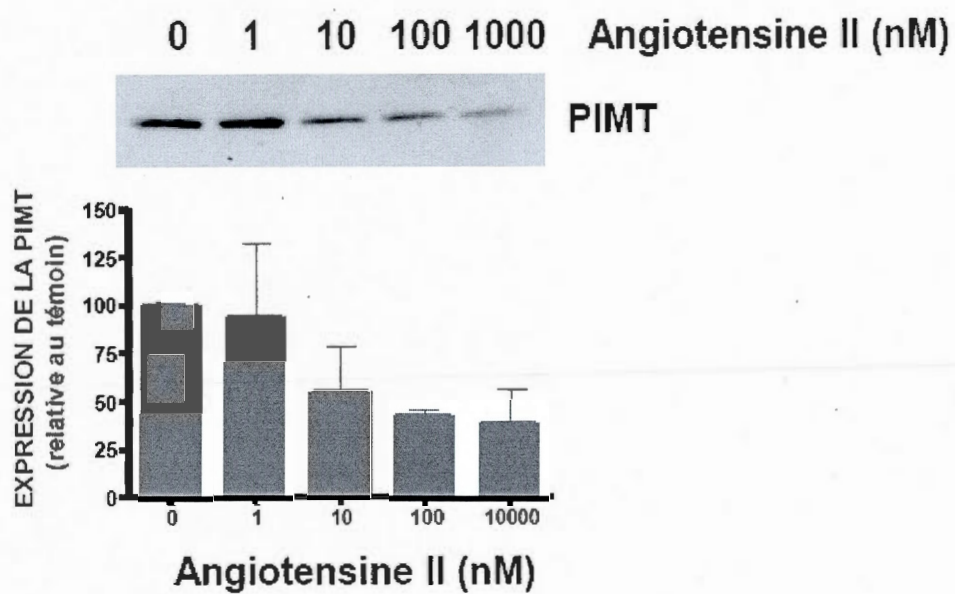


Figure 1.3 Effet de l'angiotensine II sur l'expression de la PIMT dans les cellules SH-SY5Y.

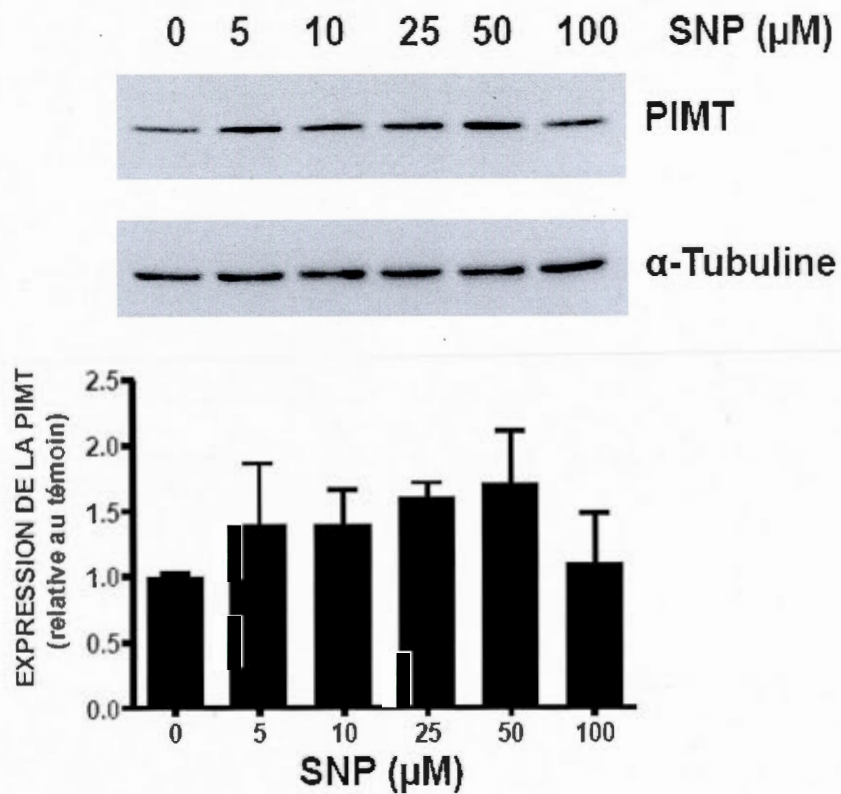


Figure 1.4 Effet du donneur d'oxyde nitrique SNP (nitroprusside de sodium) sur l'expression de la PIMT dans les cellules U87.

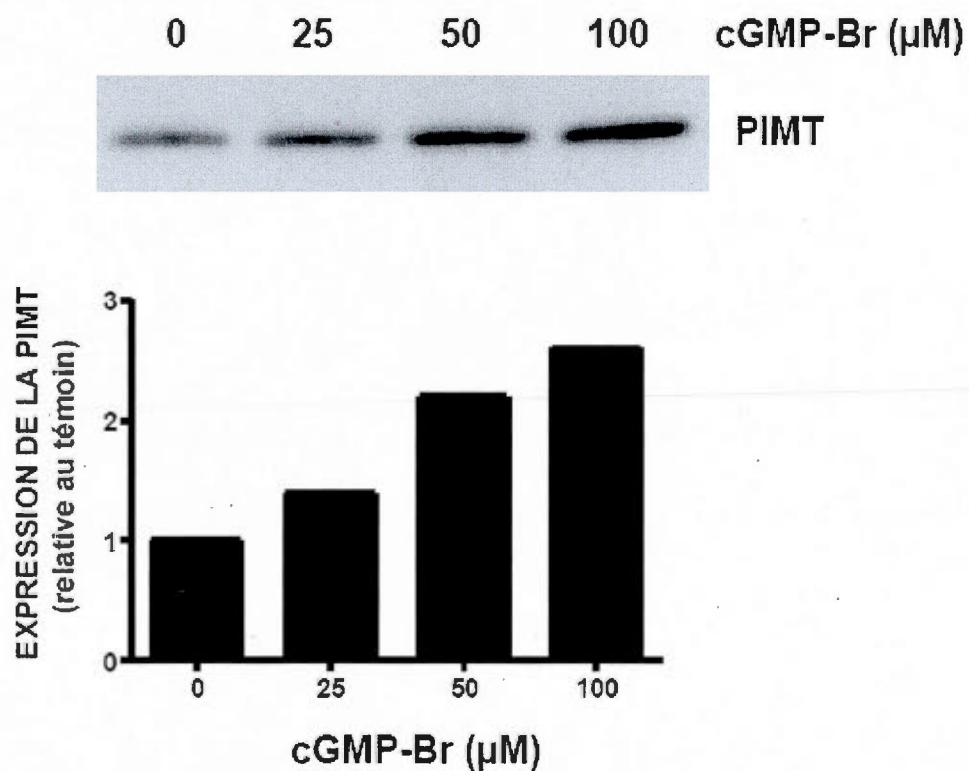


Figure 1.5 Le 8-Bromoguanosine 3',5'-cyclique monophosphate (cGMP-Br), un activateur des protéines kinases dépendantes du cGMP, induit l'expression de la PIMT dans les cellules U87.

BIBLIOGRAPHIE

- Aldini, G., Dalle-Donne, I., Colombo, R., Maffei Facino, R., Milzani, A. et Carini, M. 2006. «Lipoxidation-derived reactive carbonyl species as potential drug targets in preventing protein carbonylation and related cellular dysfunction». *ChemMedChem*, vol. 1, p. 1045-1058.
- Aswad, D. W. 1984. «Stoichiometric methylation of porcine adrenocorticotropin by carboxyl methyltransferase requires deamidation of asparagine 25». *J. Biol. Chem.*, vol. 259, p. 10714-10721.
- Axelrod, J. et Daly, J. 1965. «Pituitary gland: enzymatic formation of methanol from S-adenosylmethionine». *Science*, vol. 150, p. 892-893.
- Axelrod, J. et Diliberto, E. J. 1974. «Characterization and substrate specificity of a protein carboxymethylase in the pituitary gland». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 71, p. 1701-1704.
- Amanchy, R., Kalume, D. E., Iwahori, A., Zhong, J. et Pandey, A. 2005. «Phosphoproteome analysis of HeLa cells using stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC)». *J. Proteome Res.*, vol. 4, p. 1661-1671.
- Arnér, E. S. J., Björnstedt, M. et Holmgren, A. 1995. «1-Chloro-2,4-dinitrobenzene is an irreversible inhibitor of human thioredoxin reductase». *J. Biol. Chem.*, vol. 270, p. 3479-3482.
- Arnér, E. S. J., Zhong, L. et Holmgren, A. 1999. «Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase». *Methods Enzymol.*, vol. 300, p. 226-239.
- Babior, B. M., Lambeth, J. D. et Nauseef, W. 2002. «The neutrophil NADPH oxidase», *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 397, p. 342-344.
- Ballesteros, M., Fredriksson, A., Henriksson, J. et Nyström T. 2001. «Bacterial senescence: protein oxidation in non-proliferating cells is dictated by the accuracy of the ribosomes». *EMBO J.*, vol. 20, p. 5280-5289.
- Barten, D. M., et O'Dea, R. F. 1990. «The function of protein carboxymethyltransferase in eucaryotic cells». *Life Sci.*, vol. 47, p. 181-194.

- Beasley, K. D. et Toms, S. A. 2011. «The molecular pathobiology of metastasis to the brain: a review». *Neurosurg. Clin. N. Am.*, vol. 22, p. 7-14.
- Bedard, K. et Krause, K. H. 2007. «The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology». *Physiol. Rev.*, vol. 87, p. 245-313.
- Bennett, E. J., Bjerregaard, J., Knapp, J. E., Chavous, D. A., Friedman, A. M., Royer, W. E. et O'Connor, C.M. 2003. «Catalytic implications from the *Drosophila* protein L-isoaspartyl methyltransferase structure and site-directed mutagenesis». *Biochemistry*, vol. 42, p. 12844-12853.
- Biaglow, J. E., Ayene, I. S., Tuttle, S. W., Koch, C. J., Donahue, J. et Mieyal, J. J. 2006. «Role of vicinal protein thiols in radiation and cytotoxic responses». *Radiat. Res.*, vol. 165, p. 307-317.
- Bielecka, A. M. et Obuchowicz, E. 2008. «Antiapoptotic action of lithium and valproate». *Pharmacol Rep*, vol. 60, p. 771-782.
- Billingsley, M. L., Kim, S. et Kuhn, D. M. 1985. Immunohistochemical localization of protein-O-carboxymethyltransferase in rat brain neurons. *Neuroscience*, vol. 15, p. 159-171.
- Boeve, B. F. 2007. «Parkinson-related dementias». *Neurol. Clin.*, vol. 25, p. 761-781.
- Boivin, D., Bilodeau, D. et Béliveau, R. 1995. «Immunochemical characterization of L-isoaspartyl-protein carboxyl methyltransferase from mammalian tissues». *Biochem. J.*, vol. 309, p. 993-998.
- Bona, M., Antalík, M., Gazová, Z., Kuchár, A., Dadák, V. et Podhradský, D. 1993. «Interaction of carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone with cytochrome c oxidase». *Gen. Physiol. Biophys.*, vol. 12, p. 533-542.
- Boveris, A. 1984. «Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria». *Methods Enzymol.*, vol. 105, p. 429-435.
- Brown, D. I. et Griendling, K. K. 2009. «Nox proteins in signal transduction». *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 47, p. 1239-1253.
- Brunello, N. 2004. «Mood stabilizers: protecting the mood...protecting the brain». *J. Affect. Disord.*, vol. 79, p. 15-20.

- Busciglio, J., Pelsman, A., Wong, C., Pigino, G., Yuan, M., Mori, H. et Yankner, B. A. 2002. «Altered metabolism of the amyloid beta precursor protein is associated with mitochondrial dysfunction in Down's syndrome». *Neuron*, vol. 33, p. 677-688.
- Cairns, N. J., Lee, V. M. et Trojanowski, J. Q. 2004. «The cytoskeleton in neurodegenerative diseases». *J. Pathol.*, vol. 204, p. 438-49.
- Carrillo, M. C., Kanai, S., Nokubo, M. et Kitani, K. 1991. «(-) deprenyl induces activities of both superoxide dismutase and catalase but not of glutathione peroxidase in the striatum of young male rats». *Life Sci.*, vol. 48, p. 517-21.
- Chaudhari, A. A., Seol, J. W., Kang, S. J. et Park, S. Y. 2008. «Mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species generation regulate the enhanced effect of CCCP on TRAIL-induced SNU-638 cell apoptosis». *J. Vet. Med. Sci.*, vol. 70, p. 537-542.
- Chen, W., Ji, J. and Ru, B. 2005. « Proteomic analysis of corticobasal degeneration : a case study of corticobasal degeneration at the proteome level ». *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.*, vol. 17, p. 364-371.
- Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., Meir, E. G. et Lambeth, J. D. 2001. «Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, Nox5». *Gene*, vol. 269, p. 131-140.
- Chiappetta, G., Ndiaye, S., Igbaria, A., Kumar, C., Vinh, J. et Toledano, M. B. 2010. «Proteome screens for Cys residues oxidation: the redoxome». *Methods Enzymol.*, vol. 473, p. 199-216.
- Chondrogianni, N. et Gonos, E. S. 2010. «Proteasome function determines cellular homeostasis and the rate of aging». *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 694, p. 38-46.
- Clarke, S. 1985. «Protein carboxyl methyltransferases: two distinct classes of enzymes». *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 54, p. 479-506.
- Clarke, S. et Lowenson, J. D. 1992. «Recognition of D-aspartyl residues in polypeptides by the erythrocyte L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase. Implications for the repair hypothesis». *J. Biol. Chem.*, vol. 267, p. 5985-5995.
- Clarke, S. 2003. «Aging as war between chemical and biochemical processes: Protein methylation and the recognition of age-damaged proteins for repair». *Ageing Res. Rev.*, vol. 2, p. 263-285.

- Comeau, S. R. et Camacho, C. J. 2005. «Predicting oligomeric assemblies: N-mers a primer». *J. Struct. Biol.*, vol. 150, p. 233-244.
- Correas, I. et Avila, J. 1988. «Erythrocyte protein 4.1 associates with tubulin». *Biochem. J.*, vol. 255, p. 217-221.
- Cortesi, L., Barchetti, A., De Matteis, E., Rossi, E., Della Casa, L., Marcheselli, L., Tazzioli, G., Lazzaretti, M. G., Ficarra, G., Federico, M. et Iannone, A. 2009. «Identification of protein clusters predictive of response to chemotherapy in breast cancer patients». *J. Proteome Res.*, vol. 8, p. 4916-4933.
- Cournoyer, P. et Desrosiers, R. R. 2009. «Valproic acid enhances protein L-isoaspartyl methyltransferase expression by stimulating extracellular signal-regulated kinase signaling pathway». *Neuropharmacology*, vol. 56, p. 839-848.
- Cozzolino, M., Pesaresi, M. G., Amori, I., Crosio, C., Ferri, A., Nencini, M. et Carri, M. T. 2009. «Oligomerization of mutant SOD1 in mitochondria of motoneuronal cells drives mitochondrial damage and cell toxicity». *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 11, p. 1547-1558.
- Cueille, N., Blanc, C. T., Riederer, I. M. et Riederer, B. M. 2007. «Microtubule-associated protein 1B binds glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase». *J. Proteome Res.*, vol. 6, p. 2640-2647.
- D'Angelo, S., Ingrosso, D., Perfetto, B., Baroni, A., Zappia, M., Lobianco, L. L., Tufano, M. A. et Galletti, P. 2001. «UVA irradiation induces L-isoaspartyl formation in melanoma cell proteins». *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 31, p. 1-9.
- David, C. L., Szumlanski, C. L., DeVry, C. G., Park-Hah, J. O., Clarke, S., Weinshilboum, R. M. et Aswad, D. W. 1997. « Human erythrocyte protein L-isoaspartatyl methyltransferase : heritability of basal activity and genetic polymorphism for thermal stability ». *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 335, p. 321-332.
- de Arriba, S. G., Krügel, U., Regenthal, R., Vissiennon, Z., Verdaguer, E., Lewerenz, A., García-Jordá, E., Pallas, M., Camins, A., Münch, G., Nieber, K. et Allgaier, C. 2006. «Carbonyl stress and NMDA receptor activation contribute to methylglyoxal neurotoxicity». *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 40, p. 779-790.
- Desrosiers, R. R. et Fanélus, I. 2011. «Damaged proteins bearing L-isoaspartyl residues in aging: a dynamic equilibrium between generation of isomerized forms and repair by PIMT». *Curr. Aging Sci.*, In press.

- Deverman, B. E., Cook, B. L., Manson, S. R., Niederhoff, R. A., Langer, E. M., Rosová, I., Kulans, L. A., Fu, X., Weinberg, J. S., Heinecke, J. W., Roth, K. A. et Weintraub, S. J. 2002. «Bcl-xL deamidation is a critical switch in the regulation of the response to DNA damage». *Cell*, vol. 111, p. 51-62.
- DeVry, C. G., Tsai, W. et Clarke, S. 1996. «Structure of the human gene encoding the protein repair L-isoaspartyl (D-aspartyl) O-methyltransferase». *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 335, p. 321-332.
- Diakowski, W., Grzybek, M. et Sikorski, A. F. 2006. «Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily». *Folia Histochem. Cytobiol.*, vol. 44, p. 231-248.
- Diliberto, E. J. et Axelrod, J. 1974. «Characterization and substrate specificity of a protein carboxymethylase in the pituitary gland». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 71, p. 1701-1704.
- Diliberto, E. J. et Axelrod, J. 1976. «Regional and subcellular distribution of protein carboxymethylase in brain and other tissues». *J. Neurochem.*, vol. 26, p. 1159-1165.
- Dukan, S., Farewell, A., Ballesteros, M., Taddei, F., Radman, M. et Nyström T. 2000. «Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, p. 5746-5749.
- Elahi, M. M., Kong, Y. X. et Matata, B. M. 2009. «Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease». *Oxid. Med. Cell Longev.*, vol. 2, p. 259-269.
- Farrar, C., Houser, C. R. et Clarke, S. 2005. «Activation of the PI3K/Akt signal transduction pathway and increased levels of insulin receptor in protein repair-deficient mice». *Aging Cell*, vol. 4, p. 1-12.
- Felician, O., Koric, L. et Rochefort, N. 2009. «La dégénérescence corticobasale : aspects cliniques et neuropsychologiques». *Psychol. Neuropsychiatr. Vieil.*, vol. 7, p. 91-100.
- Fukui, T., Ishizaka, N., Rajagopalan, S., Laursen, J. B., Capers, Q. 4th., Taylor, W. R., Harrison, D. G., de Leon, H., Wilcox, J. N. et Griendling, K. K. 1997. «p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats». *Circ. Res.*, vol. 80, p. 45-51.

- Fukui, H. et Moraes, C. T. 2008. «The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis?». *Trends Neurosci.*, vol. 31, p. 251-256.
- Furuchi, T., Sakurako, K., Katane, M., Sekine, M. et Homma, H. 2010. «The role of protein L-isoaspartyl/D-aspartyl O-methyltransferase (PIMT) in intracellular signal transduction». *Chem. Biodivers.*, vol. 7, p.1337-1348.
- Fountoulakis, M., Juranville, J. F., Dierssen, M. et Lubec, G. 2002. «Proteomic analysis of the fetal brain». *Proteomics*, vol. 2, p. 1547-1576.
- Galletti, P., De Bonis, M. L., Sorrentino, A., Raimo, M., D'Angelo, S., Scala, I., Andria, G., D'Aniello, A., Ingrosso, D. et Zappia, V. 2007. «Accumulation of altered aspartyl residues in erythrocyte proteins from patients with Down's syndrome». *FEBS J.*, vol. 274, p. 5263-5277.
- Gildemeister, O. S., Pepe, J. A., Lambrecht, R. W. et Bonkovsky, H. L. 2001. «Induction of heme oxygenase-1 by phenylarsine oxide. Studies in cultured primary liver cells». *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 226, p. 17-26.
- Gingras, D. Ménard, P. et Béliveau, R. 1991. «Protein carboxyl methylation in kidney brush-border membranes». *Biochim. Biophys. Acta.*, vol. 1066, p. 261-267.
- Gingras, D. Boivin, D. et Béliveau, R. 1994. «Asymmetrical distribution of L-isoaspartyl protein carboxyl methyltransferases in the plasma membranes of rat kidney cortex». *Biochem. J.*, vol. 297, p. 145-150.
- Gladyshev, V. N., Jeang, K. T. et Stadtman, T. C. 1996. «Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, p. 6146-6151.
- Goggins, M., Scott, J. M. et Weir, D. G. 1999. «Methylation of cortical brain proteins from patients with HIV infection». *Acta Neurol. Scand.*, vol. 100, p. 326-331.
- Gomord, V. et Faye, L. 2004. «Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants». *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 7, p. 171-181.
- Grill, J. D. et Cummings, J. L. 2010. «Current therapeutic targets for the treatment of Alzheimer's disease». *Expert Rev. Neurother.*, vol. 10, p. 711-728.

- Halic, M., Gartmann, M., Schlenker, O., Mielke, T., Pool, M. R., Sinning, I. et Beckmann, R. 2006. «Signal recognition particle receptor exposes the ribosomal translocon binding site». *Science*, vol. 312, p. 745-747.
- Han, Z., Varadharaj, S., Giedt, R.J., Zweier, J.L., Szeto, H.H. et Alevriadou B.R. «Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate heme oxygenase-1 expression in sheared endothelial cells». *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 329, p. 94-101.
- Harrison, F. E. et May, J. M. 2009. «Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2». *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 46, p. 719-730.
- Huebscher, K. J., Lee, J., Rovelli, G., Ludin, B., Matus, A., Stauffer, D. et Fürst, P. 1999. «Protein isoaspartyl methyltransferase protects from Bax-induced apoptosis ». *Gene.*, vol. 240, p. 333-341.
- Huerta, S., Goulet, E. J., Huerta-Yepez, S. et Livingston, E. H. 2007. «Screening and detection of apoptosis». *J. Surg. Res.*, vol. 139, p. 143-156.
- Hwang, C. S., Shemorry, A. et Varshavsky, A. 2010. «N-terminal acetylation of cellular proteins creates specific degradation signals». *Science*, vol. 327, p. 973-977.
- Ikegaya, Y., Yamada, M., Fukuda, T., Kuroyanagi, H., Shirasawa, T. et Nishiyama, N. 2001. «Aberrant synaptic transmission in the hippocampal CA3 region and cognitive deterioration in protein-repair enzyme-deficient mice». *Hippocampus*, vol. 11, p. 287-298.
- Ingrosso, D., Cimmino, A., D'Angelo, S., Alfinito, F., Zappia, V. et Galletti, P. 2002. «Protein methylation as a marker of aspartate damage in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes: role of oxidative stress». *Eur. J. Biochem.*, vol. 269, p. 2032-2039.
- Ingrosso, D., D'angelo, S., di Carlo, E., Perna, A. F., Zappia, V. et Galletti, P. 2000. «Increased methyl esterification of altered aspartyl residues in erythrocyte membrane proteins in response to oxidative stress». *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, p. 4397-4405.
- Janiszewski, M., Pedro, M. A., Scheffer, R. C. H., Van Asseldonk, J. T. H., Souza, L. C., Luz, P. L., Augusto, O. et Laurindo, F. R. M. 2000. «Inhibition of vascular NADH/NADPH oxidase activity by thiol reagents: lack of correlation with cellular glutathione redox status». *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 29, p. 889-899.

- Johnson, B. A., Murray, E. D., Clarke, S., Glass, D. B. et Aswad, D. W. 1987. «Protein carboxyl methyltransferase facilitates conversion of atypical L-isoaspartyl peptides to normal L-aspartyl peptides». *J. Biol Chem.*, vol. 262, p. 5622-5629.
- K. C., S., Cárcamo, J. M. et Golde, D. W. 2005. «Vitamin C enters mitochondria via facilitative glucose transporter 1 (Glut1) and confers mitochondrial protection against oxidative injury». *FASEB J.*, vol. 19, p. 1657-1667.
- Kharbanda, K. K., Mailliard, M. E., Baldwin, C. R., Sorrell, M. F. et Tuma, D. J. 2007. «Accumulation of proteins bearing atypical isoaspartyl residues in livers of alcohol-fed rats is prevented by betaine administration: effects on protein-L-isoaspartyl methyltransferase activity». *J. Hepatol.*, vol. 46, p. 1119-1125.
- Kim, S. et Paik, W. K. 1970. «Purification and properties of protein methylase II». *J. Biol. Chem.*, vol. 245, p. 1806-1813.
- Konarkowska, B., Aitken, J. F., Kistler, J., Zhang, S. et Cooper, G. J. 2005. «Thiol reducing compounds prevent human amylin-evoked cytotoxicity». *FEBS J.*, vol. 272, p. 4949-4959.
- Korge, P., Goldhaber, J. I. et Weiss, J. N. 2001. «Phenylarsine oxide induces mitochondrial permeability transition, hypercontracture, and cardiac cell death». *Am J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 280, p. 2203-2213.
- Kort, E. N., Goy, M. F., Larsen, S. H. et Adler, J. 1975. «Methylation of a membrane protein involved in bacterial chemotaxis». *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, vol. 72, p. 3939-3943.
- Kostrouchova, M., Kostrouch, Z., Kostrouchova, M., 2007. «Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways». *Folia Biol.*, vol. 53, p. 37-49.
- Lamarre, M. et Desrosiers, R. R. 2008. «Up-regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase expression by lithium is mediated by glycogen synthase kinase-3 inactivation and beta-catenin stabilization». *Neuropharmacology*, vol. 55, p. 669-676.
- Laemmli, U. K. 1970. «Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4». *Nature*, vol. 227, p. 680-685.
- Lanthier, J., Bouthillier, A., Lapointe, M., Demeule, M., Beliveau, R. et Desrosiers, R. R. 2002. «Down-regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase in human epileptic hippocampus contributes to generation of damaged tubulin». *J. Neurochem.*, vol. 83, p. 581-591.

- Lanthier, J. et Desrosiers, R. R. 2004. «Protein L-isoaspartyl methyltransferase repairs abnormal aspartyl residues accumulated in vivo in type-I collagen and restores cell migration». *Exp. Cell Res.* vol. 293, p. 96-105.
- Lapointe, M., Lanthier, J., Moumdjian, R., Régina, A. et Desrosiers, R. R. 2005. «Expression and activity of L-isoaspartyl methyltransferase decrease in stage progression of human astrocytic tumors». *Brain Res. Mol. Brain Res.*, vol. 135, p. 93-103.
- Le Cabec, V. et Maridonneau-Parini, I. 1995. «Complete and reversible inhibition of NADPH oxidase in human neutrophils by phenylarsine oxide at a step distal to membrane translocation of the enzyme subunits». *J. Biol. Chem.*, vol. 270, p. 2067-2073.
- Lee, H. R., Cho, J. M., Shin, D. H., Yong, C. S., Choi, H. G., Wakabayashi, N. et Kwak, M. K. 2008. «Adaptive response to GSH depletion and resistance to L-buthionine-(S,R)-sulfoximine: involvement of Nrf2 activation». *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 318, p. 23-31.
- Leu, J. I., Pimkina, J., Frank, A., Murphy, M. E. et George, D. L. 2009. «A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70». *Mol. Cell.*, vol. 36, p. 15-27.
- Li, H. M., Niki, T., Taira, T., Iguchi-Ariga, S. M. et Ariga, H. 2005. «Association of DJ-1 with chaperones and enhanced association and colocalization with mitochondrial Hsp70 by oxidative stress». *Free Radic. Res.*, vol. 39, p. 1091-1099.
- Lim, M. L., Minamikawa, T. et Nagley, P. 2001. «The protonophore CCCP induces mitochondrial permeability transition without cytochrome c release in human osteosarcoma cells». *FEBS Lett.*, vol. 503, p. 69-74.
- Lindner, H. et Helliger, W. 2001. «Age-dependent deamidation of asparagine residues in proteins». *Exp. Gerontol.*, vol. 36, p. 1551-1563.
- Liss, M. et Edelstein, L. M. 1967. «Evidence for the enzymatic methylation of crystalline ovalbumin preparations». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 26, p. 497-504.
- Liss, M. et Maxam, A. M. 1967. «Methylation of ovalbumin and human serum albumin by a purified enzyme from calf spleen». *Biochim. Biophys. Acta.*, vol. 140, p. 555-557.
- Liss, M., Maxam, A. M. et Cuprak, L. J. 1969. «Methylation of protein by calf spleen methylase. A new protein methylation reaction». *J. Biol. Chem.*, vol. 244, p. 1617-1622.

- Lowenson, J. D. et Clarke, S. 1991. «Structural elements affecting the recognition of L-isoAsp residues by the L-isoAsp protein methyltransferase. Implications for the repair hypothesis». *J. Biol. Chem.*, vol. 266, p. 19396-19406.
- Lowenson, J. D., Kim, E., Young, S. G. et Clarke, S. 2001. «Limited accumulation of damaged proteins in l-isoaspartyl (D-aspartyl) O-methyltransferase-deficient mice». *J. Biol. Chem.*, vol. 276, p. 20695-20702.
- Lu, S. C. 2009. «Regulation of glutathione synthesis». *Mol. Aspects Med.*, vol. 30, p. 42-59.
- Lu, T., Pan, Y., Kao, S. Y., Li, C., Kohane, I., Chan, J. et Yankner, B. A. 2004. «Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain». *Nature*, vol. 429, p. 883-891.
- MacLaren, D. C., Kagan, R. M. et Clarke, S. 1992b. «Alternative splicing of the human isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase RNA leads to the generation of a C-terminal -RDEL sequence in isozyme II». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 185, p. 277-283.
- MacLaren, D. C., O'Connor, C. M., Xia, Y. R., Mehrabian, M., Klisak, I., Sparkes, R. S., Clarke, S. et Lusk, A. J. 1992a. «The L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase gene (PCMT1) maps to human chromosome 6q22.3-6q24 and the syntenic region of mouse chromosome 10». *Genomics*, vol. 14, p. 852-866.
- Magyar, K., Szende, B., Jenei, V., Tábi, T., Pálfi, M. et Szökö, E. 2010. «R-Deprenyl: Pharmacological Spectrum of its Activity». *Neurochem. Res.*, vol. 35, p. 1922-1932.
- May, J. M., Li, L., Hayslett, K. et Qu, Z. C. 2006. «Ascorbate transport and recycling by SH-SY5Y neuroblastoma cells: response to glutamate toxicity». *Neurochem. Res.*, vol. 31, p. 785-794.
- McFarland, R., Taylor, R. W. et Turnbull, D. M. 2010. «A neurological perspective on mitochondrial disease». *Lancet Neurol.*, vol. 9, p. 829-840.
- Mendiratta, S., Qu, Z.-C. et May, J. M. 1998. «Enzyme-dependent ascorbate recycling in human erythrocytes : role of thioredoxin reductase». *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 25, p. 221-228.
- Merad-Boudia, M., Nicole, A., Santiard-Baron, D., Saillé, C. et Ceballos-Picot, I. 1998. «Mitochondrial impairment as an early event in the process of apoptosis induced by glutathione depletion in neuronal cells: relevance to Parkinson's disease». *Biochem. Pharmacol.*, vol. 56, p. 645-655.

- Millar, T. M., Phan, V. et Tibbles, L. A. 2007. «ROS generation in endothelial hypoxia and reoxygenation stimulates MAP kinase signaling and kinase-dependent neutrophil recruitment». *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 42, p. 1165-1177.
- Mitchell, L. E., Adzick, N. S., Melchionne, J., Pasquariello, P. S., Sutton, L. N. et Whitehead, A. S. 2004. «Spina bifida». *Lancet*, vol. 364, p.1885-1895.
- Mizobuchi, M., Murao, K., Takeda, R. et Kakimoto, Y. 1994. «Tissue-specific expression of isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase gene in rat brain and testis». *J. Neurochem.*, vol. 62, p. 322-328.
- Molina, H., Bunkenborg, J., Reddy, G.H., Muthusamy, B., Scheel, P. J. et Pandey, A. 2005. «A proteomic analysis of human hemodialysis fluid». *Mol. Cell Proteomics.*, vol. 4, p. 637-650.
- Monteiro, H. P., Arai, R. J., et Travassos, L. R. 2008. «Protein tyrosine phosphorylation and protein tyrosine nitration in redox signaling». *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 10, p. 843-889.
- Murphy, M. P. 2009. «How mitochondria produce reactive oxygen species». *Biochem. J.*, vol. 417, p. 1-13.
- Murray, E. D. et Clarke, S. 1984. «Synthetic peptide substrates for the erythrocyte protein carboxyl methyltransferase. Detection of a new site of methylation at isomerized L-aspartyl residues». *J. Biol. Chem.*, vol. 259, p. 10722-10732.
- Najbauer, J., Orpiszewski, J. et Aswad D. W. 1996. «Molecular aging of tubulin: accumulation of isoaspartyl sites in vitro and in vivo». *Biochemistry*, vol. 35, p. 5183-5190.
- Nickel, W. et Seedorf, M. 2008. «Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells». *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, vol. 24, p. 287-308.
- Nordberg, J. et Arnér, E. S. 2001. «Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system». *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 31, p. 1287-1312.
- O'Donnell, B. V., Tew, D. G., Jones, O. T. et England P. J. 1993. «Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase». *Biochem. J.*, vol. 290, p. 41-49.

- Paik, W. K. et Kim, S. 1973. «Protein methylases during the development of rat brain». *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 313, p. 181-189.
- Pallis, M. Bradshaw, T. D., Westwell, A. D., Grundy, M., Stevens, M. F. G. et Russell, N. 2003. «Induction of apoptosis without redox catastrophe by thioredoxin-inhibitory compounds». *Biochem. Pharmacol.*, vol. 66, p. 1695-1705.
- Payan, I. L., Chou, S. J., Fisher, G. H., Man, E. H., Emory, C. et Frey, W. H. 2nd. 1992. «Altered aspartate in Alzheimer neurofibrillary tangles». *Neurochem. Res.*, vol. 17, p. 187-191.
- Potter, S. M., Johnson, B. A., Henschen, A., Aswad, D. W. et Guzzetta, A. W. 1992. «The type II isoform of bovine brain protein L-isoaspartyl methyltransferase has an endoplasmic reticulum retention signal (...RDEL) at its C-terminus». *Biochemistry*, vol. 31, p. 6339-6347.
- Pozzi Mucelli, S., Odreman, F., Gonzales, M. L., Gerardi, E., Stanta, G. et Vindigni, A. 2006. «Proteomic studies on the white matter of human brain». *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 833, p. 80-90.
- Prayson, R. A. 2010. «Tumours arising in the setting of paediatric chronic epilepsy». *Pathology*, vol. 42, p. 426-431.
- Purvis, A. R., Gross, J., Dang, L. T., Huang, R. H., Kapadia, M., Townsend, R. R. et Sadler, J. E. 2007. «Two Cys residues essential for von Willebrand factor multimer assembly in the Golgi». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 104, p. 15647-15652.
- Qin, B., Cartier, L., Dubois-Dauphin, M., Li, B., Serrander, L. et Krause, K. H. 2005. «A key role for the microglial NADPH oxidase in APP-dependent killing of neurons». *Neurobiol. Aging*, vol. 27, p. 1577-1587.
- Reddy, P. H. 2008. «Mitochondrial medicine for aging and neurodegenerative diseases». *Neuromolecular Med.*, vol. 10, p. 291-315.
- Rengby, O., Johansson, L., Carlson, L. A., Serini, E., Vlamis-Gardikas, A., Karsnäs, P. et Arnér, E. S. 2004. «Assessment of production conditions for efficient use of *Escherichia coli* in high-yield heterologous recombinant selenoprotein synthesis». *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, p. 5159-5167.

- Reissner, K. J. et Aswad, D. W. 2003. «Deamidation and isoaspartate formation in proteins: unwanted alterations or surreptitious signals?». *Cell Mol. Life Sci.*, vol. 60, p. 1281-1295.
- Riederer, B. M. 2007. «Microtubule-associated protein 1B, a growth-associated and phosphorylated scaffold protein». *Brain Res. Bull.*, vol. 71, p. 541-558.
- Riganti, C., Gazzano, E., Polimeni, M., Costamagna, C., Bosia, A. et Ghigo, D. 2004. «Diphenyliodonium inhibits the cell redox metabolism and induces oxidative stress». *J. Biol. Chem.*, vol. 279, p. 47726-47731.
- Robinson, A. B. et Robinson, N. E. 2004. *Molecular Clocks : deamidation of asparaginyl and glutaminyl residues in peptides and proteins*. U.S.A. : Althouse Press, 419 p.
- Rokutan, K., Miyoshi, M., Tesshima, S., Kawai, T., Kawahara, T. et Kishi, K. 2000. «Phenylarsine oxide inhibits heat shock protein 70 induction in cultured guinea pig gastric mucosal cells». *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 279, p. 1506-1515.
- Rosenberg, G., 2007. «The mechanisms of action of valproate in neuropsychiatric disorders: can we see the forest for the trees?». *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 64, p. 2090-2103.
- Rötig, A. et Munnich, A. 2003. «Genetic features of mitochondrial respiratory chain disorders». *J. Am. Soc. Nephrol.* vol. 14, p. 2995-3007.
- Ryttersgaard, C., Griffith, S.C., Sawaya, M. R., MacLaren, D. C., Clarke, S. et Yeates, T. O. 2002. «Crystal structure of human L-isoaspartyl methyltransferase». *J. Biol. Chem.*, vol. 277, p. 10642-10646.
- Shimizu, T., Ikegami, T., Ogawara, M., Suzuki, Y., Takahashi, M., Morio, H. et Shirasawa, T. 2002. «Transgenic expression of the protein-L-isoaspartyl methyltransferase (PIMT) gene in the brain rescues mice from the fatal epilepsy of PIMT deficiency». *J. Neurosci. Res.*, vol. 69, p. 341-352.
- Shimizu, T., Matsuoka, Y. et Shirasawa, T. 2005. «Biological significance of isoaspartate and its repair system». *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 28, p. 1590-1596.
- Shimizu, T., Watanabe, A., Ogawara, M., Mori, H. et Shirasawa T. 2000. «Isoaspartate formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease». *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 381, p. 225-234.

- Shirasawa, T., Endoh, R., Zeng, Y. X., Sakamoto, K. et Mori, H. 1995. «Protein L-isoaspartyl methyltransferase: developmentally regulated gene expression and protein localization in the central nervous system of aged rat». *Neurosci. Lett.*, vol. 188, p. 37-40.
- Skinner M. M., Puvathingal, J. M., Walter, R. L. et Friedman, A. M. 2000. «Crystal structure of protein isoaspartyl methyltransferase: a catalyst for protein repair». *Structure*, vol. 8, p. 1189-1201.
- Smalla, K. H., Mikhaylova, M., Sahin, J., Bernstein, H. G., Bogerts, B., Schmitt, A., van der Schors, R., Smit, A. B., Li, K. W., Gundelfinger, E. D. et Kreutz, M. R. 2008. «A comparison of the synaptic proteome in human chronic schizophrenia and rat ketamine psychosis suggest that prohibitin is involved in the synaptic pathology of schizophrenia». *Mol. Psychiatry*, vol. 13, p. 878-96.
- Smith, C. G., Carson, M., Friedman, A. M., Skinner, M. W., Delucas, L., Chantalat, L., Weise, L., Shirasawa, T. et Chattopadhyay, D. 2002. «Crystal structure of human L-isoaspartyl-O-méthyltransferase with S-adenosyl homocysteine at 1.6 Å resolution and modeling of an isoaspartyl-containing peptide at the active site». *Protein Sci.*, vol. 11, p. 625-635.
- Sorce, S. et Krause, K. H. 2009. «NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease». *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 11, p. 2481-504.
- Squier, T. C. 2001. «Oxidative stress and protein aggregation during biological aging». *Exp. Gerontol.* vol. 36, p. 1539-50.
- Staatz, W. D., Fok, K. F., Zutter, M. M., Adams, S. P., Rodriguez, B. A. et Santoro, S. A. 1991. «Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the alpha 2 beta 1 integrin in collagen». *J. Biol. Chem.*, vol. 266, p. 7363-7367.
- Stadtman, E. R. 2004. «Role of oxidant species in aging». *Curr. Med. Chem.*, vol. 11, p. 1105-1112.
- Stambolic, V., Ruel, L. et Woodgett, J. R., 1996. «Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells». *Curr. Biol.*, vol. 12, p. 1664-1668.
- Steiner, J., Bielau, H., Brisch, R., Danos, P., Ullrich, O., Mawrin, C., Bernstein, H. G. et Bogerts, B. 2008. «Immunological aspects in the neurobiology of suicide: elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide». *J. Psychiatr. Res.*, vol. 42, p. 151-157.

- Stocken, L. A., Thompson, R.H.S. 1946. «British anti-Lewisite. 1. Arsenic derivatives of thiol proteins». *Biochem. J.* vol. 40, p. 529-535.
- Sun, H. B. 2010. «Mechanical loading, cartilage degradation, and arthritis». *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1211, p. 37-50.
- Tatton, W. G., Jum W. Y., Holland, D. P., Tai, C. et Kwan, M. 1994. «(-)-Deprenyl reduces PC12 cell apoptosis by inducing new protein synthesis». *J. Neurochem.*, vol. 63, p. 1572-1575.
- Taylor, S. W., Fahy, E., Zhang, B., Glenn, G. M., Warnock, D. E., Wiley, S., Murphy, A. N., Gaucher, S. P., Capaldi, R. A., Gibson, B. W. et Ghosh, S. S. 2003. «Characterization of the human heart mitochondrial proteome». *Nat. Biotechnol.* vol. 21, p. 281-286.
- Thapar, N., Griffith, S. C., Yeates, T. O. et Clarke, S. 2002. «Protein repair methyltransferase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Unusual methyl-accepting affinity for D-aspartyl and N-succinyl-containing peptides». *J. Biol. Chem.*, vol. 277, p.1058-65.
- Turcotte, S., Desrosiers, R. R., et Béliveau, R. 2003. «HIF-1 α mRNA and protein upregulation involves Rho GTPase expression during hypoxia in renal cell carcinoma». *J. Cell Sci.*, vol. 116, p. 2247-2260.
- Vallet, P., Charnay, Y., Steger, K., Ogier-Denis, E., Kovari, E., Herrmann, F., Michel, J. P. et Szanto, I. 2005. «Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, its regulation in mouse experimental brain ischemia». *Neuroscience*, vol. 132, p. 233-238.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. et Telser, J. 2007. «Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease». *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 39, p. 44-84.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. et Mazur, M. 2006. «Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer». *Chem. Biol. Interact.*, vol. 160, p. 1-40.
- Waldbaum, S. et Patel, M. 2010. «Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy». *Epilepsy Res.*, vol. 88, p. 23-45.
- Wang, X. et Michaelis, E. K. 2010. «Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain». *Front. Aging Neurosci.*, vol. 30, p. 2-12.

- Watanabe, A., Takio, K. et Ihara, Y. 1999. «Deamidation and isoaspartate formation in smeared tau in paired helical filaments. Unusual properties of the microtubule-binding domain of tau». *J. Biol Chem.*, vol. 274, p. 7368-7378.
- Wilson, R. S., Leurgans, S. E., Boyle, P. A., Schneider, J. A. et Bennett, D. A. 2010. «Neurodegenerative basis of age-related cognitive decline». *Neurology*, vol. 75, p. 1070-1078.
- Xu, Q., Belcastro, M. P., Villa, S. T., Dinkins, R. D., Clarke, S. G. et Downie, A. B. 2004. «A second protein L-isoaspartyl methyltransferase gene in Arabidopsis produces two transcripts whose products are sequestered in the nucleus». *Plant Physiol.*, vol. 136, p. 2652-2664.
- Yamamoto, A., Takagi, H., Kitamura, D., Tatsuoka, H., Nakano, H., Kawano, H., Kuroyanagi, H., Yahagi, Y., Kobayashi, S., Koizumi, K., Sakai, T., Saito, K., Chiba, T., Kawamura, K., Suzuki, K., Watanabe, T., Mori, H. et Shirasawa, T. 1998. «Deficiency in protein L-isoaspartyl methyltransferase results in a fatal progressive epilepsy». *J. Neurosci.*, vol. 18, p. 2063-2074.
- Zhang, T. D., Chen, G. Q., Wang, Z. G., Wang, Z. Y., Chen, S. J. et Chen, Z. 2001. «Arsenic trioxide, a therapeutic agent for APL». *Oncogene*, vol. 20, p. 7146-7153.
- Zhong, L., Arnér, E. S., Ljung, J., Aslund, F. et Holmgren, A. 1998. «Rat and calf thioredoxin reductase are homologous to glutathione reductase with a carboxyl-terminal elongation containing a conserved catalytically active penultimate selenocysteine residue». *J. Biol Chem.*, vol. 273, p. 8581-8591.
- Zhu, H., Pan, R. J., Wang, T. W., Shen, Y. L. et Wei, D. Z. 2006. «Functional solubilization of aggregation-prone TRAIL protein facilitated by coexpressing with protein isoaspartate methyltransferase». *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 72, p. 1033-1038.
- Zhu, H., Yang, W., Lu, W., Zhang, J., Shaw, G. M., Lammer, E. J. et Finnell, R. H. 2006. «A known functional polymorphism (Ile120Val) of the human PCMT1 gene and risk of spina bifida». *Mol. Genet. Metab.*, vol. 87, p. 66-70.